

**Université de Montréal**

**Corrélation entre la sévérité de la maladie et le profil granulocytaire en maladie de Crohn**

**Par Amélie Therrien**

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Sciences biomédicales  
Option médecine expérimentale

Avril 2018

© Amélie Therrien, 2018

**Université de Montréal**

Ce mémoire intitulé :

**Corrélation entre la sévérité de la maladie et le profil granulocytaire en maladie de Crohn**

Présenté par :

**Amélie Therrien**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Prévost Jantchou**

Président-rapporteur

**Dre Marika Sarfati**

Directrice de recherche

**Dr Mickael Bouin**

Codirecteur de recherche

**Dre Emilia Liana Falcone**

Membre du jury

## Résumé

Les neutrophiles infiltrent la muqueuse colique inflammatoire en maladie de Crohn (CD). Cependant, on ignore l'existence d'une corrélation entre la sévérité endoscopique et la fréquence et/ou l'activation des neutrophiles et autres granulocytes.

Une cohorte de 73 patients atteints de CD fut recrutée prospectivement. Les participants furent stratifiés selon la Classification de Montréal ou subdivisés selon le phénotype endoscopique (phénotype typique vs apparence endoscopique « UC-Like »). L'index d'Harvey Bradshaw (HBI) et le Simple Endoscopic score (SES-CD) furent calculés au moment de la coloscopie. La fréquence et l'expression de CD66b et de CD64 sur les granulocytes furent évaluées en cytométrie de flux sur des échantillons sanguins et des biopsies coliques.

Le SES-CD corrélait avec l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants en présence de maladie active avec comportement inflammatoire (B1). Les fréquences des neutrophiles et des basophiles mais non des éosinophiles étaient augmentées au sein de la muqueuse inflammatoire, mais la fréquence des neutrophiles coliques n'était corrélée avec le SES-CD uniquement en présence d'un phénotype endoscopique « UC-like ». Deux scores d'activation granulocytaire étaient discriminant entre les individus avec maladie légère et sévère dans l'ensemble de la cohorte avec maladie active.

L'activation des granulocytes dans le sang et la muqueuse colique corrèle avec le SES-CD dans des sous-groupes de patients avec une maladie B1, alors que les scores d'activation granulocytaire pourraient être pertinent cliniquement pour évaluer la sévérité de la maladie et possiblement avoir une valeur pronostique parmi les individus avec maladie active.

**Mots-clés:** Maladie de Crohn; neutrophile; granulocyte; SES-CD; CD64; CD66b

## Abstract

Neutrophils infiltrate the inflamed colon in Crohn's disease (CD). However, correlation between endoscopic severity, and frequency and/or activation of neutrophils and other granulocytes like basophils and eosinophils remains to be investigated.

A cohort of 73 CD patients was prospectively enrolled according to endoscopic severity and treatment history. Patients with active disease were stratified according to Montreal classification or subdivided into typical CD and UC-like endoscopic features. Harvey Bradshaw Index (HBI) and Simple Endoscopic score (SES-CD) were performed at the time of ileocolonoscopy. Frequency and expression of CD66b and CD64 on granulocytes were assessed in paired blood and colonic biopsies using flow cytometry.

SES-CD correlated with neutrophil CD66b expression in mucosa but not blood and conversely, with neutrophil CD64 expression in blood but not mucosa in CD patients with inflammatory (B1) active disease. Frequencies of neutrophils and basophils but not eosinophils, increased in inflamed colon, but only in a subgroup of CD patients presenting "UC-like" endoscopic features were the frequencies of colonic neutrophils correlated with SES-CD. Furthermore, a neutrophil activation score (CD66b X CD64 on neutrophils) and a blood granulocyte score (CD66b on eosinophils X CD64 on neutrophils) discriminated between mild and severe disease in the entire cohort of patients with active disease.

Activation of granulocytes in blood and/or mucosa correlated with SES-CD in subgroups of patients with B1 inflammatory disease while granulocyte activation scoring systems may be clinically relevant to evaluate disease severity and predict prognosis in the entire cohort of active disease patients.

**Keywords:** Crohn's Disease; neutrophil; granulocyte; SES-CD; CD64; CD66b

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Liste des tableaux .....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles .....	xv
Remerciements.....	xix
Introduction générale .....	1
Chapitre 1 – Description phénotypique .....	3
1.1 Localisation de la maladie .....	3
1.2 Comportement de la maladie .....	4
1.3 Phénotype endoscopique de la maladie de Crohn colique .....	4
Chapitre 2 - Scores d'activité.....	6
2.1 Scores d'activité clinique .....	6
2.2 Scores d'activité endoscopique .....	6
2.3 Scores d'activité histologique .....	7
2.4 Corrélation entre les scores cliniques, endoscopiques et histologiques .....	8
2.5 Corrélation entre les scores cliniques, endoscopiques, histologiques et des marqueurs inflammatoires .....	10
Chapitre 3 - Granulocytes et maladie de Crohn .....	12
3.1 Neutrophiles .....	12
3.1.1 Généralités et propriétés en inflammation .....	12
3.1.2 Marqueurs d'activation des neutrophiles .....	15
3.1.2.1 CD66b .....	15

3.1.2.2 CD64.....	16
3.2 Dysfonction neutrophilique en maladie de Crohn .....	17
3.3 Évaluation des neutrophiles et de leur activation en maladie de Crohn.....	18
2.2 Éosinophiles.....	20
2.2.1 Généralités et propriétés en inflammation .....	20
2.2.2 Marqueurs d'activation des eosinophiles .....	22
2.2.3 Eosinophiles en maladie de Crohn .....	23
2.3 Basophiles et mastocytes.....	25
2.3.1 Généralités et propriétés en inflammation .....	25
2.3.2 Propriétés anti-inflammatoires .....	27
2.3.3 Basophiles et mastocytes en maladie de Crohn.....	27
Objectifs de travail .....	30
Matériels et méthodes .....	32
1. <i>Participants</i> .....	32
2. <i>Considérations éthiques</i> .....	33
3. <i>Caractérisation de la maladie</i> .....	33
Méthode expérimentale .....	34
1. <i>Sang</i> .....	34
2. <i>Digestion tissulaire</i> .....	35
3. <i>Cytométrie de flux</i> .....	35
Justification du choix des anticorps pour l'identification des sous-populations granulocytaires.....	37
1. <i>Neutrophiles et éosinophiles</i> .....	38
2. <i>Basophiles et mastocytes</i> .....	38
Confirmation morphologique .....	39

Analyse des données.....	40
1. <i>Fréquences cellulaires</i> .....	40
2. <i>Mean fluorescence Intensity</i> .....	41
3. <i>Analyses statistiques</i> .....	42
Résultats.....	43
Description de la cohorte de participants .....	43
1. Caractéristiques cliniques .....	43
2. Évaluation de la sévérité clinique et endoscopique .....	47
3. Protéine C réactive et calprotectine fécale.....	48
Évaluation quantitative des populations granulocytaires dans la muqueuse et dans le sang en fonction de l'activité de la maladie .....	49
1. Les neutrophiles infiltrent la muqueuse colique inflammatoire, peu importe le phénotype de la maladie .....	49
2. La fréquence des neutrophiles coliques corrèle avec le SES-CD uniquement parmi les individus avec un phénotype endoscopique UC-like .....	52
3. Une faible augmentation des neutrophiles circulants est associée à l'activité endoscopique de la maladie de Crohn .....	54
4. La fréquence des éosinophiles circulants est faiblement corrélée au SES-CD parmi les individus avec phénotype endoscopique typique.....	56
5. Effets du traitement sur les fréquences des neutrophiles et des éosinophiles .	57
6. La muqueuse inflammatoire est infiltrée par des basophiles. ....	61
Expression du CD66b et du CD64 à la surface des neutrophiles et des éosinophiles en fonction de la sévérité de la maladie .....	66
1. L'activation des neutrophiles coliques et circulants corrèle avec le SES-CD chez les individus avec maladie active non sténosante non fistulisante (B1).....	66
2. L'activation des éosinophiles circulants corrèle avec le SES-CD .....	75

Scores d'activation granulocytaire pour évaluer la sévérité de la maladie.....	81
Corrélations avec la sévérité endoscopique en fonction de la localisation de la maladie .....	92
Évaluation longitudinale des scores d'activation granulocytaires .....	94
Discussion.....	96
1. L'activation et non la fréquence des neutrophiles est corrélée avec la sévérité de la maladie de Crohn .....	97
2. Les participants avec phénotype UC-like étaient-ils atteints d'une colite ulcéreuse? .....	101
3. Expression du CD64 sur les neutrophiles en maladie de Crohn adulte.....	102
4. Quelle est l'implication des eosinophiles et de leur expression du CD66b en maladie de Crohn? .....	106
5. Pourquoi y avait-il préférentiellement des basophiles et mastocytes au sein de la muqueuse des individus avec maladie B1?.....	108
6. Pourquoi y avait-il moins de basophiles circulants parmi les individus avec maladie de Crohn active?.....	110
7. Effets du traitement sur les résultats observés.....	111
8. Certaines corrélations avec le SES-CD étaient influencées par la localisation de la maladie .....	111
9. Utilité des scores d'activation granulocytaire proposés.....	114
10. Quels autres index d'activité aurions-nous pu utiliser?.....	117
Conclusions générales et perspectives futures .....	119
ANNEXE I .....	122
ANNEXE II.....	123
ANNEXE III .....	124
ANNEXE IV .....	125



ANNEXE V .....	126
ANNEXE VI .....	127
ANNEXE VII.....	128
Références .....	129

## Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques cliniques de la cohorte au moment du recrutement.....	44
Tableau II. Répartition des sous-groupes de traitement selon le phénotype endoscopique, le comportement et la localisation de la maladie.....	46
Tableau III. Indices de sévérité clinique et endoscopique.....	47
Tableau IV. Corrélations entre les fréquences des neutrophiles et des eosinophiles et le SES-CD selon les sous-groupes.....	60
Tableau V. Corrélations entre les fréquences des basophiles et mastocytes et le SES-CD selon les sous-groupes.....	64
Tableau VI. Corrélations entre l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles circulants et coliques et le SES-CD selon les sous-groupes. ....	72
Tableau VII. Corrélations entre l'expression du CD66b et du CD64 sur les eosinophiles circulants et coliques et le SES-CD selon les sous-groupes. ....	79
Tableau VIII. Résumé des corrélations observées entre les fréquences cellulaires et marqueurs d'activation et le SES-CD.....	80
Tableau IX. Performances du CD66b et du CD64 pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète.....	83
Tableau X. Performances du CD66b et du CD64 pour discriminer les individus avec maladie endoscopique sévère.....	85
Tableau XI. Corrélations entre l'expression des marqueurs d'activation individuels, ainsi que le score d'activation neutrophilique et le SES-CD. ....	86
Tableau XII. Performances du score d'activation neutrophilique pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète et ceux avec maladie endoscopique sévère .....	88
Tableau XIII. Corrélations entre l'expression des marqueurs d'activation individuels, ainsi que le score d'activation granulocytaire sanguin et le SES-CD.....	89

Tableau XIV. Performances du score d'activation granulocytaire sanguin pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète et ceux avec maladie endoscopique sévère .....	91
Tableau XV. Corrélations entre les différents paramètres et le SES-CD selon la localisation de la maladie.....	93

## Liste des figures

Figure 1. Stratégie de tri des cellules par cytométrie de flux et identification morphologique des neutrophiles et eosinophiles.....	39
Figure 2. Corrélation entre les fréquences des neutrophiles circulants observées par chacun des analystes.....	40
Figure 3. Corrélation entre la fréquence des cellules hématopoïétiques dans la muqueuse colique et la sévérité de la maladie.....	41
Figure 4. Représentation des sous-groupes de patients.....	43
Figure 5. Corrélation entre la sévérité clinique et endoscopique en présence de maladie active.....	48
Figure 6. Corrélations entre les marqueurs inflammatoires et le SES-CD parmi les individus avec maladie active.....	48
Figure 7. Fréquences des neutrophiles et des éosinophiles dans la muqueuse colique selon l'activité de la maladie.....	49
Figure 8. Fréquences des neutrophiles au sein de la muqueuse colique selon le comportement et le phénotype endoscopique de la maladie.....	50
Figure 9. Fréquences des eosinophiles au sein de la muqueuse colique selon le phénotype endoscopique et le comportement de la maladie.....	51
Figure 10. Corrélation entre la fréquence des neutrophiles coliques et le SES-CD selon le phénotype et comportement de la maladie.....	53
Figure 11. Fréquences des neutrophiles et des éosinophiles circulants selon l'activité de la maladie.....	54
Figure 12. Fréquences des neutrophiles et éosinophiles circulants selon le comportement et le phénotype de la maladie.....	55
Figure 13. Corrélations entre la fréquence des neutrophiles et des eosinophiles circulants et le SES-CD selon le phénotype endoscopique.....	56

Figure 14. Fréquences des neutrophiles circulants et au sein de la muqueuse inflammée en fonction du traitement.....	58
Figure 15. Fréquences des éosinophiles circulants et coliques en fonction du traitement .....	59
Figure 16. Fréquences des basophiles et mastocytes coliques selon l'activité, le comportement et le phénotype de la maladie.....	62
Figure 17. Fréquences des basophiles circulants selon l'activité, le comportement et le phénotype de la maladie.....	63
Figure 18. Corrélation entre la fréquence des basophiles coliques et celles des autres granulocytes en présence de maladie active. ....	65
Figure 19. Expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique en fonction de l'activité, du phénotype et du comportement de la maladie.....	67
Figure 20. Expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique en fonction du traitement.....	67
Figure 21. Corrélation entre l'expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique et le SES-CD. ....	68
Figure 22. Expression du CD64 sur les neutrophiles circulants en fonction de l'activité, du phénotype et du comportement de la maladie. ....	69
Figure 23. Expression du CD64 sur les neutrophiles coliques et circulants selon le comportement de la maladie. ....	70
Figure 24. Corrélation entre l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants et le SES-CD.....	71
Figure 25. « Dot plot » représentatif de l'expression du CD64 et du CD66b sur les neutrophiles du sang et du colon selon l'activité de la maladie. ....	73
Figure 26. Corrélations entre l'expression du CD64 et du CD66b sur les neutrophiles du sang et de la muqueuse .....	74
Figure 27. Expression du CD66b sur les éosinophiles circulants. ....	75

Figure 28. Expression du CD66b sur les eosinophiles coliques et circulants selon le comportement de la maladie. ....	76
Figure 29. Corrélation entre l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants et coliques parmi les individus avec phénotype endoscopique typique et maladie B1.....	77
Figure 30. « Dot plot » représentatif de l'expression du CD64 et du CD66b sur les eosinophiles du sang et du colon selon l'activité de la maladie.....	78
Figure 31. Expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants selon la présence de guérison muqueuse complète.....	82
Figure 32. Expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants selon la sévérité endoscopique de la maladie. ....	84
Figure 33. Score d'activation neutrophilique. ....	87
Figure 34. Score d'activation granulocytaire sanguin. ....	90
Figure 35. Variation des scores en fonction de l'évolution de la maladie.....	95

## Liste des sigles

5-ASA	5-Aminosalicylates
A1	Maladie de Crohn diagnostiquée avant l'âge de 17 ans
A2	Maladie de Crohn diagnostiquée entre l'âge de 17 et 40 ans
A3	Maladie de Crohn diagnostiquée après l'âge de 40 ans
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
APC	Allophycocyanin
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
B1	Maladie de Crohn au comportement inflammatoire
B2	Maladie de Crohn au comportement sténosant
B3	Maladie de Crohn au comportement fistulisant
CD	<i>Crohn's Disease</i> , Maladie de Crohn
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i>
CDEIS	<i>Crohn's Disease Index of Severity</i>
CGHAS	<i>Colonic Global Histologic Activity Score</i>
CRP	Protéine C réactive
CXCR	<i>CXC chemokine receptor</i>
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i> , protéine cationique eosinophilique
EDN	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i> , neurotoxine dérivée de l'eosinophile
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGP	<i>Eosinophil granule proteins</i> , protéines issues de granules eosinophiliques
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i>
EPX	<i>Eosinophil peroxidase</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FcαRI	Récepteur pour la portion Fc des immunoglobulines A
FcεRI	Récepteur de haute affinité pour la portion Fc des immunoglobulines E
FcγRI	Récepteur de haute affinité pour la portion Fc des immunoglobulines G
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i> , marqueur de lymphocyte T régulateur
FPR-1	<i>Formyl peptide receptor</i>
FSC	<i>Forward scatter signal</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i> , facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GHAS	<i>Global Histologic Activity Score</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> , facteur de stimulation des colonies de granulocytes-monocytes
GMP	<i>Granulocyte – monocyte precursor</i> , précurseur des granulocytes-monocytes
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
H & E	Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
HBI	<i>Harvey-Bradshaw Index</i>
HIF	Hypoxia-inducible factor
Hp	<i>High power field</i> , fort grossissement
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IGHAS	<i>Ileal Global Histologic Activity Score</i>
IL	Interleukine
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
IOIBD	<i>International Organization for Inflammatory Bowel Disease</i>
IQR	<i>Interquartile range</i> , écart interquartile
IRM	Imagerie par résonance magnétique
L1	Maladie de Crohn exclusivement iléale
L2	Maladie de Crohn exclusivement colique



L3	Maladie de Crohn iléocolique
LPS	Liposaccharides
MBP	<i>Major basic protein</i> , protéine basique majeure
MC	<i>Mast cells</i> , mastocytes
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , intensité moyenne de la fluorescence
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complexe d'histocompatibilité majeur
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	<i>Neutrophils extracellular traps</i> , pièges extra-cellulaires
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PCDAI	<i>Pediatric Crohn's Disease Activity Index</i>
PE	R-phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PGP	Proline-glycine-proline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SES-CD	<i>Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease</i>
SSC	<i>Side scatter signal</i>
T <sub>EM</sub>	Lymphocyte T effecteur mémoire
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> , facteur de croissance transformant bêta
Th	<i>T helper</i> , T auxillaire
TNFα	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> , lymphopoïétine stromale thymique
Typical CD	Maladie de Crohn avec phénotype endoscopique typique
Typical CD-B1	Maladie de Crohn avec phénotype endoscopique typique et comportement inflammatoire (non sténosant non fistulisant)

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
UC-like	<i>Ulcerative colitis like</i> , colite de Crohn s'apparentant à la colite ulcéreuse

# Remerciements

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à

Dre Marika Sarfati pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis d'entreprendre ce projet, ainsi que pour son enseignement au courant des trois dernières années, sa rigueur scientifique et sa très grande disponibilité. Vous m'avez transmis une structure et un style de rédaction qui m'inspireront dans mes projets futurs;

Laurence Chapuy, Marwa Bsat, Manuel Rubio, Shunya Mashiko et Heena Mehta, pour leur amitié, leur enseignement et leur aide pour poursuivre les manipulations lorsque je ne pouvais combiner laboratoire et tâches cliniques;

Tous les patients qui ont accepté de participer à ce projet de recherche;

Les membres du service de gastroentérologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, mes collègues et amis résidents, les infirmières d'endoscopie, Carole Bergeron, Stephanie Côté-Daigneault, Gabriel Bernard, Evelyne Wassef et Nathanaelle Galette, pour avoir contribué au recrutement et au prélèvement des échantillons;

Dr Mickael Bouin, pour avoir cru en moi et toujours supportée depuis mon tout premier projet de recherche en gastroentérologie;

Dr Jacques Lacroix, Dre Josée Dubois et Dre Marie-Josée Dupuis pour m'avoir permis d'intégrer le programme clinicien-chercheur et de poursuivre cette maîtrise pendant ma résidence de gastroentérologie;

Dr Michel Lemoyne et Dr Benoit-Pierre Panzini, pour avoir toujours soutenu ma candidature;

Les Instituts de Recherche en Santé du Canada et le Fonds de recherche du Québec – Santé;

Denyse Vezina, pour la révision linguistique d'une portion de ce travail;

Mes parents, pour qui mon bonheur et ma réussite ont toujours été la première priorité;

Hugues, qui a toujours des solutions.

## Introduction générale

La maladie de Crohn fut décrite pour la première fois en Amérique du Nord par Burrill B Crohn, Leon Ginzburg et Gordon Oppenheimer en 1932 <sup>1</sup>. On estime maintenant que plus de 129 000 Canadiens en sont atteints <sup>2</sup>. Son incidence chez l'adulte connaît un pic entre l'âge de 20 et 30 ans <sup>3</sup>. Elle atteint surtout l'iléon et le colon, mais peut affecter l'ensemble du tube digestif de la bouche à l'anus <sup>3</sup>. Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique se traduisant cliniquement par une inflammation transmurale du tube digestif avec ulcérations de la muqueuse, sténoses et/ou fistules. On estime que la majorité des individus présentent au moment du diagnostic un phénotype inflammatoire, comparativement à environ 4,6% avec un phénotype sténosant et 14% avec un phénotype pénétrant <sup>4</sup>.

L'évaluation de la sévérité de la maladie de Crohn a connu plusieurs paradigmes, allant de la quantification des signes et symptômes, de la sévérité des lésions muqueuses à l'évaluation de l'impact de la maladie selon le patient <sup>5,6</sup>. Contrairement à la colite ulcéreuse, en raison de la discontinuité de l'atteinte inflammatoire, une corrélation entre la sévérité de l'atteinte évaluée lors de l'endoscopie et l'évaluation histologique peut s'avérer imparfaite. <sup>7,8</sup>

La physiopathologie de la maladie est complexe et non complètement élucidée à ce jour, mais implique une réponse inadéquate des cellules de l'immunité innée et adaptative à des éléments du microbiote intestinal chez des individus génétiquement susceptibles, le tout initié par certains déclencheurs environnementaux <sup>9</sup>. Au niveau histologique, on note une inflammation chronique focale (présence accrue de lymphocytes et plasmocytes dans la lamina propria ainsi qu'une distorsion architecturale des cryptes) et des granulomes, mais souvent également une inflammation active surajoutée, se traduisant par une infiltration de l'épithélium et des cryptes par des polymorphonucléaires (neutrophiles et éosinophiles) <sup>10,11</sup>. Malgré leur présence établie au sein de la muqueuse inflammée, le rôle de chaque sous-type

granulocytaire dans la physiopathologie de la maladie demeure imprécis. Plusieurs mécanismes soutiennent l'hypothèse d'une immunodéficience des neutrophiles <sup>12-14</sup>, mais d'autres études contemporaines évoquent plutôt un rôle de ceux-ci dans l'immunité Th17 <sup>15, 16</sup>. De fait, en plus des granulocytes, la pathogenèse de la maladie implique diverses cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques, « natural killer cells » (NK cells), « innate lymphoid cells » (ILC)) et de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T). Nous ne nous intéresserons cependant qu'aux granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et mastocytes.

Le présent ouvrage débutera par une présentation de la classification et des divers scores cliniques, endoscopiques et histologiques évaluant la sévérité de la maladie de Crohn. Nous détaillerons par la suite les rôles potentiels des diverses sous-populations granulocytaires dans la maladie pour finalement poser notre question de recherche : y a-t-il une corrélation entre la sévérité de la maladie de Crohn et la fréquence et l'activation des granulocytes circulants et coliques. Les buts de l'étude seront donc de quantifier par cytométrie de flux les granulocytes dans le sang et la muqueuse colique ainsi que les mastocytes tissulaires chez les individus atteints de maladie de Crohn colique. Ensuite, nous déterminerons s'il existe une corrélation entre la fréquence de chaque population granulocytaire dans la muqueuse et dans le sang, ainsi qu'entre l'expression de marqueur d'activation à la surface de ces cellules et la sévérité endoscopique de la maladie. Enfin, nous évaluerons si la fréquence ou l'activation de ces granulocytes peuvent indiquer l'activité et la sévérité de la maladie.

## Chapitre 1 – Description phénotypique

La maladie de Crohn comprend une gamme de présentations cliniques incluant diverses localisations et manifestations. En 2005, la Classification de Montréal fut établie pour uniformiser la description de la maladie <sup>17</sup>. **(Annexe I)**

### 1.1 Localisation de la maladie

La maladie de Crohn peut être exclusivement iléale, iléocolique, colique, multi-étagée ou bien atteindre le tube digestif haut <sup>3, 17</sup>. On estime que le colon est atteint chez 50% des individus et que cette atteinte est exclusivement colique chez 10-20% d'entre eux <sup>18, 19</sup>. La localisation de la maladie demeure stable dans le temps; une étude rétrospective de cohorte à la fin du vingtième siècle avec un suivi allant jusqu'à 25 ans a démontré une modification de la localisation chez environ 16% des individus; par contre, ce changement étant pour la plupart d'une localisation iléale ou colique vers iléocolique, il est possible que l'étendue de la maladie de ces patients n'ait pas été adéquatement évaluée initialement selon les pratiques de l'époque <sup>19</sup>. Certaines différences génétiques en fonction de la localisation de la maladie suggèrent que la maladie de Crohn iléale est une entité distincte de la maladie de Crohn colique <sup>20</sup>. Par exemple, les Crohn iléaux sont davantage porteurs de mutation NOD2 CARD15<sup>17</sup> alors que l'allèle HLA DRB1\*0103 est plus fréquemment présente parmi les individus avec maladie de Crohn colique pure <sup>21</sup>. Cependant, les particularités génétiques de la maladie de Crohn ne seront pas détaillées dans cette introduction car elles n'ont pas été examinées dans notre étude.

Notre cohorte de participants est constituée d'individus avec une maladie de Crohn colique ou iléocolique, représentant donc un sous-groupe correspondant à environ 50% de la population atteinte de la maladie de Crohn.

## 1.2 Comportement de la maladie

Une étude de cohorte populationnelle a estimé qu'environ 80% des individus présentent au moment du diagnostic un phénotype inflammatoire, comparativement à 4,6% pour un phénotype sténosant et 14% avec un phénotype fistulisant <sup>4</sup>. Par contre, d'autres études antérieures à celle-ci par plus de dix ans rapportaient une prévalence de maladies sténosantes d'au moins 10% <sup>19</sup>. Cette différence pourrait indiquer que nous diagnostiquons actuellement plus précocément la maladie de Crohn alors qu'elle présente un comportement non sténosant non fistulisant. Par contre, la prévalence de maladie sténosante pourrait être sous-estimée, d'une part, du fait qu'elle peut ne pas être décelable cliniquement initialement et d'autre part, du fait qu'elle est classifiée comme étant une maladie pénétrante (B3) lorsqu'associée à la présence de fistules <sup>22</sup>. Des études antédantant l'utilisation des anti-TNF ont démontré un risque de progression d'une maladie purement inflammatoire vers un comportement sténosant ou fistulisant allant de 45.9 à 60% sur 10 à 20 ans <sup>4, 19, 23</sup>. Deux études pédiatriques récentes ont cependant démontré une réduction du risque de progression de la maladie avec l'utilisation précoce d'anti-TNF <sup>24, 25</sup>. La répartition du comportement de la maladie parmi notre cohorte de patient est représentative de la répartition décrite dans la littérature.

## 1.3 Phénotype endoscopique de la maladie de Crohn colique

Comparativement à l'iléite de Crohn, la colite est moins associée aux phénotypes sténosants et fistulissants <sup>3, 21</sup>. La distinction entre la maladie de Crohn colique et la colite ulcéreuse peut d'ailleurs être complexe chez certains patients<sup>26</sup>. En effet, l'évaluation histologique de spécimens de colectomie a révélé un phénotype « UC-like », c'est-à-dire une forme de maladie qui ressemble cliniquement et histologiquement à la colite ulcéreuse, avec une inflammation superficielle de la muqueuse <sup>18, 26</sup>. L'importance de distinguer les deux diagnostics peut être un enjeu chirurgical; une proctocolectomie avec réservoir iléoanal chez un individu avec un diagnostic ultérieur de maladie de Crohn est associée à un risque accru d'échec du réservoir

et de complications <sup>27</sup>. Une étude récente a démontré que parmi les individus ayant bénéficié d'une résection colique pour maladie de Crohn dans un centre de référence, 14% de ceux avec une atteinte exclusivement colique et 13% de ceux avec une atteinte iléocolique avaient un phénotype « UC-Like » <sup>28</sup>. Plusieurs caractéristiques permettent de suspecter une maladie de Crohn chez des individus avec une apparence de colite ulcéreuse, notamment la présence d'une maladie de Crohn typique dans l'intestin grêle avec inflammation chronique active histologique, la présence de granulomes épithélioïdes non associés à des cryptes rompues, une atteinte périanale, ou une atteinte colique segmentaire et/ou épargne du rectum au moment du diagnostic <sup>18</sup>. Une étude récente comparant des individus avec une colite de Crohn « UC-like » à des individus atteints d'une colite ulcéreuse a décrit une atteinte proximale plus sévère ainsi que la présence d'une iléite active, d'une infiltration importante de la lamina propria par des neutrophiles et une fréquence accrue d'aggrégats lymphoïdes proéminents chez les individus avec une maladie de Crohn « UC-like » <sup>29</sup>. Nous avons observé un phénotype « UC-like » chez 26.3% de nos participants avec maladie active.



## Chapitre 2 - Scores d'activité

Des critères cliniques, paracliniques, endoscopiques et histologiques ont été établis pour définir l'activité de la maladie de Crohn<sup>30-32</sup>. Des scores objectifs avec des variables qualitatives et quantitatives ont été conçus pour des fins de recherche et sont également utilisés dans l'évaluation de la sévérité de la maladie<sup>5</sup>.

### 2.1 Scores d'activité clinique

Le *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI), établi par le *National Cooperative Crohn's disease Study Group* en 1976, demeure le score le plus souvent utilisé dans les études cliniques<sup>33</sup>. **(Annexe II)** Chaque paramètre a une pondération différente et on définit la rémission clinique comme étant un score inférieur à 150, une maladie légère ayant un score de 150 à 220, modérée, de 220 à 450, et sévère si le score est supérieur à 450<sup>33</sup>. Une variante simplifiée excluant les variables du poids, de l'hématocrite et de la prise d'anti-diarrhéiques a été conçue et validée, soit le *Harvey-Bradshaw Index* (HBI) et est bien corrélée au CDAI<sup>34, 35</sup>. Ce score est plus simple à calculer et n'implique pas un rappel du nombre de selles dans les sept derniers jours **(Annexe III)**. Selon le HBI, un patient est considéré comme étant en rémission avec un score  $\leq 4$ <sup>34</sup>, avec une maladie légère si le score est de 5 à 7, modérée, de 8-16 et sévère lorsque  $> 16$ <sup>1\*</sup>. Nous avons ainsi retenu le HBI comme score d'évaluation clinique pour notre étude.

### 2.2 Scores d'activité endoscopique

Au niveau endoscopique, le *Crohn's Disease Endoscopic Index Score* (CDEIS) fut créé et validé en 1989<sup>36</sup>. **(Annexe IV)** Son point fort demeure la reproductibilité, mais ce score est difficile à comptabiliser et peut sous-estimer l'atteinte lorsqu'un seul segment est très atteint, étant

---

<sup>1\*</sup> « Worksheet based on the Harvey-Bradshaw Index », Ministère de la santé de la Colombie-Britannique  
<https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/health/forms/5374fil.pdf>

donné qu'il reflète la moyenne des scores de chaque segment exploré <sup>37</sup>. Les seuils de rémission ou de réponse au traitement demeurent non validés et variables d'une étude à l'autre. Par exemple, les auteurs de l'étude *EXTEND* (essai randomisé contrôlé sur l'efficacité de l'adalimumab en maladie de Crohn) ont établi un score  $\leq 4$  comme définition de la rémission endoscopique<sup>38</sup>. Le consensus de l'*International Organization for Inflammatory Bowel Disease* (IOIBD) est qu'une rémission endoscopique complète requiert un score  $<3$  et une absence d'ulcération <sup>37</sup>. Toutefois, le calcul du score CDEIS est complexe et l'inclusion de la profondeur des ulcères comme composante diminue sa reproductibilité interobservateur <sup>39, 40</sup>. Une variante simplifiée du CDEIS, le *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD), a récemment été recommandée pour évaluer la réponse et la rémission endoscopique et peut être stratifiée en quatre catégories (rémission : 0-2, léger : 3-6, modéré : 7-15 et sévère :  $\geq 16$ ) <sup>37, 40, 41</sup>. **(Annexe V)** Le SES-CD est bien corrélé avec le CDEIS, offre une bonne reproductibilité interobservateur, mais ne tient pas compte du nombre de segments explorés, par exemple en présence d'une sténose colique infranchissable empêchant une évaluation endoscopique de tous les segments iléocoliques <sup>37, 40</sup>. Un score inférieur ou égal à 2 est considéré comme une rémission endoscopique par le consensus de l'IOIBD <sup>37</sup>. Nous avons opté pour le SES-CD pour l'évaluation de la sévérité endoscopique des participants de notre étude.

### 2.3 Scores d'activité histologique

Contrairement à la colite ulcéreuse, il existe peu de scores d'activité histologique en maladie de Crohn, et la majorité d'entre eux sont des variantes du *Global Histologic Disease Activity Score* (GHAS) <sup>42</sup>. Ce score histologique établi à la fin des années 1990 fut utilisé subséquentement dans plusieurs essais cliniques <sup>10</sup>. Il comporte une variante colique (*Colonic Global Histologic Disease Activity Score*) et iléale (*Ileal Global Histologic Disease Activity Score*) **Annexe VI**. Ce score nécessite l'évaluation d'au moins 6 biopsies du segment atteint (6 biopsies iléales étant prises dans l'étude initiale) et inclut des éléments d'inflammation active comme le dommage épithélial, la présence de neutrophiles dans l'épithélium et dans la lamina

propria, des érosions et ulcérations, mais aussi des éléments de chronicité comme des changements architecturaux, l'infiltration de cellules inflammatoires mononucléées dans la lamina propria et la présence de granulomes <sup>10</sup>. Plusieurs variantes de ce score ont été conçues, notamment le *score d'Agnholt*, le *Average Histologic Score*, le *score de Laharie*, le *score de Regueiro* et le *score de Sipponen* <sup>42</sup>. Elles impliquent soit une somme (*Score de Sipponen*) ou une moyenne des scores de chaque segment colique individuel (*Average Histologic Score*), ne comptabilisent que les changements inflammatoires (*Score d'Agnholt*) ou ne comptent qu'une seule biopsie dans la zone la plus sévèrement atteinte lors de l'endoscopie (*score de Laharie*)<sup>42</sup>. Toutefois, selon une revue systématique récente, aucun score histologique n'a cependant été jugé comment étant pleinement validé <sup>42</sup>.

Par ailleurs, contrairement à la colite ulcéreuse, le concept de rémission histologique en maladie de Crohn n'est pas retenu comme paramètre de suivi de la maladie puisque la discontinuité de l'atteinte histologique ne permet pas de conclure avec certitude qu'il n'y a aucune maladie histologique résiduelle, même si les biopsies sont normales <sup>6</sup>.

#### 2.4 Corrélation entre les scores cliniques, endoscopiques et histologiques

La corrélation entre les scores cliniques, endoscopiques et histologique est inconstante, bien que les scores cliniques soient souvent utilisés comme issue primaire dans les essais thérapeutiques en maladies inflammatoires intestinales <sup>6, 7, 43</sup>.

D'abord, l'absence de corrélation entre le CDAI et le CDEIS fut observée dès 1990, avec une étude du groupe français GETAID sur les effets de la prednisone en maladie de Crohn active <sup>44</sup>. Une étude contemporaine impliquant 164 patients n'a pas démontré non plus de corrélation significative entre le CDAI et le SES-CD <sup>45</sup>. Par contre, une revue systématique récente a mis en lumière des résultats contradictoires quant à la corrélation entre les scores cliniques (CDAI,

HBI) et endoscopiques (CDEIS, SES-CD), deux études démontrant d'excellentes corrélations et d'autres, des corrélations faibles ou absentes <sup>46</sup>. Cependant, l'étude principale montrant une forte corrélation entre le CDAI et le SES-CD n'incluait que des individus symptomatiques (CDAI > 220) <sup>39</sup> et la seconde, uniquement publiée sous forme d'abrégé, n'incluait que 18 patients <sup>47</sup>. N'inclure que des individus symptomatiques n'est pas représentatif de l'ensemble de la population avec la maladie de Crohn, puisque 47% des participants de l'étude SONIC après traitement était en rémission selon le CDAI, mais démontraient tout de même des lésions endoscopiques <sup>48</sup>. Plusieurs études ont évalué la corrélation entre les variations des scores cliniques, endoscopiques et histologiques dans le temps, présentant des observations inconstantes <sup>42, 46</sup>. Par exemple, lors de l'évaluation des scores parmi la cohorte de l'étude ACCENT-1, la variation du CDAI et du CDEIS semblaient mieux corrélées à la variation du CGHAS qu'à celle de l'IGHAS suite à un traitement d'infliximab <sup>49</sup>. De plus, ces corrélations étaient perdues après un an de traitement <sup>49</sup>.

L'activité histologique peut toutefois être corrélée à la sévérité clinique; on a démontré une corrélation entre le score d'Agnholt et le CDAI ( $r = 0.5 - 0.6$ ) <sup>50</sup>. Il est toutefois important de garder à l'esprit que le score d'Agnholt ne s'intéresse qu'aux composantes inflammatoires du score GHAS et donc plus de 50% des points de ce score est attribuée à la présence de neutrophiles. De plus, la corrélation entre le score endoscopique SES-CD et le score histologique était fortifiée en utilisant la variante du score histologique de Sipponen ( $r = 0,759$  pour le CGHAS modifié) <sup>51</sup>. Cette variation étant la somme des scores de chaque segment colique évalué, il semble offrir une meilleur évaluation de l'ensemble de l'atteinte histologique colique. En revanche, l'inflammation histologique est sous estimée en présence d'une apparence endoscopique normale. On estime que de 25 à 40% des individus atteints de la maladie de Crohn avec rémission endoscopique présentent un certain degré d'inflammation histologique <sup>7, 41</sup>.

En conclusion, les données disponibles sur les corrélations entre les divers paramètres d'évaluation de la maladie demeurent contradictoires et variables selon l'évolution de la maladie.

## 2.5 Corrélation entre les scores cliniques, endoscopiques, histologiques et des marqueurs inflammatoires

Plusieurs marqueurs inflammatoires sanguins et fécaux ont été étudié pour l'évaluation indirecte de la sévérité de la maladie. Les plus couramment utilisés sont la protéine C réactive et la calprotectine fécale.

La protéine C réactive (CRP) est une « acute phase protein » produite par les hépatocytes en réponse aux cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  <sup>52</sup>. Cependant, la production de CRP en présence d'exacerbation de la maladie de Crohn peut être variable d'un individu à l'autre, selon certains polymorphismes génétiques <sup>45</sup>. Jusqu'à 20% de la population ne produirait pas de CRP en présence de conditions inflammatoires<sup>53</sup>. De plus, cette production peut être influencée par l'âge, le sexe et l'indice de masse corporelle <sup>54</sup> et la CRP étant une « acute phase protein », elle peut être présente en circulation en réponse à n'importe quelle infection ou état inflammatoire.

La calprotectine fécale, également connue sous le nom de protéine hétérodimère S100A8/A9 dans la famille des protéines S100, est une protéine présente abondamment dans le cytoplasme des neutrophiles, mais peut être également produite par les macrophages et les monocytes <sup>53, 55, 56</sup>. Elle est donc un marqueur de la présence de ces cellules au sein de la muqueuse intestinale et permet, en deça de certains seuils, de prédire la rémission endoscopique et post-opératoire <sup>57</sup>. Elle n'est toutefois pas spécifique aux maladies inflammatoires intestinales, pouvant être élevée en présence d'infection entérique, de

polypes ou avec la prise de certains médicaments, notamment les anti-inflammatoires non stéroïdiens<sup>58</sup>.

Une revue systématique récente a démontré des corrélations positives entre le SES-CD et la CRP ( $r = 0,46 - 0,68$ ), ainsi qu'entre le SES-CD et la calprotectine fécale ( $r = 0,45 - 0,75$ )<sup>46</sup>. Ces deux marqueurs représentent de bons prédicteurs d'une maladie avec activité modérée à sévère ( $\text{SES-CD} > 7$ )<sup>45</sup>, mais il est important de retenir que 46% des individus d'une cohorte avec une évaluation endoscopique démontrant une inflammation de la muqueuse présentait concomitamment une valeur de CRP dans les limites de la normale<sup>43</sup>. Fait intéressant, une corrélation positive fut décrite entre le score histologique de Sipponen (somme des scores CGHAS de tous les segments évalués) et le taux de calprotectine fécale ( $r = 0,56$   $p < 0,01$ )<sup>51</sup>.

L'évaluation de la sévérité de la maladie de Crohn est un concept complexe, allant de paradigmes en paradigmes, et qui semble maintenant tendre vers la combinaison de l'impact sur la qualité de vie du patient, la charge de l'atteinte inflammatoire ainsi que les complications de la maladie<sup>5</sup>. Toutefois, jusqu'à tout récemment, aucun score validé ne permettait l'évaluation objective de l'ensemble de ces paramètres<sup>59</sup>. Par ailleurs, alors qu'en colite ulcéreuse, une corrélation entre la sévérité de l'infiltrat neutrophilique et l'atteinte endoscopique a été démontrée<sup>60</sup>, ainsi qu'une association entre une inflammation microscopique active (neutrophiles et eosinophiles) ou une plasmocytose basale et un risque de rechute et de complications<sup>61-64</sup>, peu de paramètres objectifs ont été corrélés à la composition quantitative et qualitative de l'infiltrat inflammatoire en maladie de Crohn. La corrélation potentielle entre la calprotectine fécale et la sévérité endoscopique de la maladie nous incite à revoir le rôle des granulocytes dans la pathogenèse de la maladie de Crohn.

## Chapitre 3 - Granulocytes et maladie de Crohn

Les granulocytes sont des cellules myéloïdes circulantes et tissulaires, se caractérisant par leurs granules cytoplasmiques. Ils sont classés en trois catégories (neutrophiles, eosinophiles et basophiles) selon l'affinité de leurs granules pour certains colorants<sup>65</sup>. Les mastocytes, uniquement présents dans les tissus, ne sont pas considérés comme des granulocytes et sont distincts des basophiles, bien qu'ils contiennent également des granules<sup>65</sup>. Pourtant, selon une étude murine récente, les mastocytes proviendraient des mêmes précurseurs *GATA1<sup>+</sup> granulocyte-monocyte precursor* (GMP) que les eosinophiles et les basophiles, alors que les neutrophiles proviennent d'une lignée commune aux monocytes et macrophages, les *GATA1<sup>-</sup> GMP*<sup>66</sup>. Notre projet portant sur l'étude des granulocytes et mastocytes en relation avec la sévérité de la maladie de Crohn, nous allons dans le prochain chapitre donner un aperçu des connaissances actuelles sur leurs rôles dans l'inflammation et dans la physiopathologie de la maladie de Crohn.

### 3.1 Neutrophiles

#### 3.1.1 Généralités et propriétés en inflammation

Les neutrophiles constituent 50 à 70% des leucocytes circulants<sup>67,68</sup>. Le GM-CSF, le G-CSF, l'IL-3 et l'IL-6 contribuent à leur maturation dans la moelle osseuse<sup>65</sup>. On compte quatre types de granules au sein de leur cytoplasme et la formation de celles-ci dépend du stade de maturation de la cellule. Les principales granules sont les granules primaires et secondaires. Les granules primaires contiennent divers enzymes telles que la myeloperoxydase (MPO), l'élastase, la cathepsin G et des metalloproteinases<sup>65,68</sup>; les granules secondaires, quant à elles, contribuent à la régénération membranaire et à limiter les effets des radicaux libres (rôle de la lactoferrin)<sup>69</sup>. Enfin, des granules tertiaires contiennent principalement de la gélatinase, et les vésicules sécrétoires contiennent des protéines plasmatiques et des récepteurs<sup>65</sup>. Les

neutrophiles expriment d'ailleurs de nombreux récepteurs qui ont pour ligands des médiateurs proinflammatoires (fMLP, leucotriène B<sub>4</sub>), des cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-6), des chimiokines, notamment l'IL-8 (CXCR1 et CXCR2), ainsi que des IgG (Fc $\gamma$ R) <sup>65</sup>.

La muqueuse colique saine est dépourvue de neutrophiles<sup>68</sup>, mais ces derniers constituent tout de même la première ligne de réponse lors d'un bris de la barrière épithéliale <sup>69</sup>. Les neutrophiles sont recrutés au sein de la muqueuse colique entre autres grâce à l'IL-8 se liant aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 présents à leur surface <sup>67, 70</sup>. L'IL-8 est une chimiokine (c'est-à-dire une cytokine chimiotactique), qui est principalement sécrétée par les macrophages et les cellules épithéliales <sup>67, 69, 70</sup>. Par contre, le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) produit par les bactéries a également un rôle chimiotactique puissant par la voie des récepteurs « formyl peptide receptor » (FPR-1) exprimés à la surface des neutrophiles <sup>67</sup> et peut également enclencher les mécanismes d'activation et d'adhésion des neutrophiles, tout comme l'IL-1 $\beta$ , le G-CSF, l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et le GM-CSF <sup>71, 72</sup>.

L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est principalement médiée par quatre types d'intégrines à la surface des neutrophiles, soit CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 et CD11d/CD18 <sup>65</sup>. Ces intégrines sont activées par l'IL-8 liée aux glycosaminoglycans de l'endothélium et permettent une adhésion très forte menant à la transmigration vers l'espace intestinal <sup>65, 73</sup>. Les neutrophiles rejoignent ensuite l'épithélium par un second processus de transmigration <sup>67</sup>. L'IL-8 est également sécrétée abondamment par les neutrophiles, entre autres, en réponse à certains fragments de collagène produits lors de la transmigration (proline-glycine-proline, PGP) ou lors de la phagocytose <sup>65, 67, 74</sup>. Leur survie au site d'inflammation ou d'infection est significativement prolongée par plusieurs médiateurs et cytokines proinflammatoires tels que le G-CSF, l'IL-8, le GM-CSF, l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et le LPS, qui inhibent leur apoptose <sup>65, 67</sup>.



Les neutrophiles ont également des actions bactéricides telles que la phagocytose, suivie du burst oxydatif, processus qui nécessite l'enzyme NADPH oxydase, entraînant la formation de radicaux libres, ainsi que l'activation des enzymes et peptides antimicrobiens contenus dans les granules et déversés dans la vacuole avec le contenu phagocyté <sup>67, 69, 75</sup>. Une dégranulation dans le milieu extracellulaire peut également survenir <sup>67</sup>. La formation de pièges extracellulaires (« neutrophils extracellular traps NETs ») constitue un autre mécanisme antimicrobien <sup>67, 68</sup>.

Les neutrophiles auraient aussi un rôle dans la résolution de l'inflammation, que ce soit en inhibant leur propre recrutement ou en augmentant leur élimination par phagocytose <sup>65</sup>. Plusieurs médiateurs sont impliqués dans ces fonctions, notamment le vascular endothelial growth factor (VEGF), la lipoxin A4, l'annexin A1, la resolvin E1 et la protectin D1; ces derniers encouragent l'efferocytose des neutrophiles par les macrophages résidents <sup>67 68</sup>. L'expression d'annexin A1 semble toutefois diminuée à la fois dans le sang et dans la muqueuse en maladie de Crohn active et sa concentration sérique était inversement corrélée à la protéine C réactive<sup>76</sup>. Par ailleurs, l'infiltration neutrophilique serait également nécessaire pour limiter le processus inflammatoire <sup>77</sup>. L'hypoxie engendrée par la transmigration épithéliale ainsi que le burst respiratoire stabilise le facteur de transcription « hypoxia-inducible factor » (HIF) exprimé par les cellules épithéliales coliques, engendrant la transcription de gènes impliqués dans la production de mucine, de peptides antimicrobiens et du métabolisme des nucléotides, permettant une restitution de la barrière intestinale <sup>77-80</sup>. Les neutrophiles produisent également de l'adénosine via la relâche d'ATP, ADP et AMP <sup>81</sup>. L'adénosine dans l'espace extracellulaire restitue l'épithélium, stabilise le HIF et inhibe le NF-kB <sup>78, 81</sup>. L'hypoxie générée par le burst respiratoire interrompt de surcroît l'infiltration de la muqueuse par les neutrophiles <sup>78</sup>.

### *3.1.2 Marqueurs d'activation des neutrophiles*

Des différents antigènes de surface et récepteurs exprimés sur les neutrophiles, nous nous intéresserons spécifiquement au CD66b et au CD64.

#### *3.1.2.1 CD66b*

Le neutrophile exprime plusieurs antigènes CD66 (CD66a-d) qui se regroupent en complexes à sa surface <sup>82</sup>. Le CD66b, aussi nommé CGM6 ou CEACAM8, est spécifique aux granulocytes comparativement aux autres CD66 qui peuvent être exprimés sur les cellules épithéliales, ainsi que dans plusieurs tissus (rein, placenta, sein, poumons)<sup>83</sup>. Il est stocké dans les granules secondaires spécifiques « gélatinases » du neutrophile avec le CD66a <sup>84</sup>. Au repos, les neutrophiles expriment très faiblement le CD66b <sup>85</sup>. Son expression est majorée en présence de GM-CSF, TNF $\alpha$ , mais aussi de fMLP <sup>84,86</sup>. Tout comme le CD66c, il est alors lié à la membrane par un lien glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), alors que le CD66a et le CD66d sont transmembranaires <sup>83</sup>. Les neutrophiles matures ainsi que les lignées immatures (promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes et band) expriment le CD66b <sup>87</sup>.

Bien que le ligand naturel du CD66b n'ait pas été formellement identifié, le galectin-3 en est un potentiel pour le CD66a et le CD66b sur les neutrophiles et éosinophiles circulants <sup>84, 85, 88</sup>. Cette lectine est produite par les macrophages et les mastocytes durant l'inflammation <sup>85</sup>. La stimulation du complexe CD66 entraîne l'adhésion cellulaire à la fibronectine par la voie des intégrines CD11b/CD18 et prépare les neutrophiles à la production de superoxydes en réponse au fMLP <sup>83, 89</sup>. Plus précisément, la liaison au CD66b augmente le calcium cytoplasmique et l'intensité du burst oxydatif <sup>82, 83</sup>. Sa stimulation provoquerait également la relâche d'IL8 déjà formée dans les neutrophiles <sup>88</sup>.

### 3.1.2.2 CD64

Le CD64 (FcγRI) est une protéine transmembranaire agissant comme un récepteur liant la portion Fc des anticorps<sup>90</sup>. Les immunoglobulines G (IgG) constituent ses ligands et il est exprimé sur les neutrophiles, mais également les autres granulocytes, les macrophages, les monocytes, les fibroblastes et les cellules dendritiques<sup>65, 91</sup>. Son expression à la surface du neutrophile est induite par l'IFNγ, qui se lie à un récepteur tyrosine kinase JAK1, ce qui amène la transcription du gène du CD64 avec l'apport du facteur de transcription STAT<sup>92</sup>. Cette séquence s'effectuerait en 4 à 6h après le contact entre l'IFNγ ou le G-CSF et le neutrophile<sup>93</sup>. Certains ont également proposé une relâche en circulation de nouveaux neutrophiles exprimant le CD64 en réponse au G-CSF<sup>94, 95</sup>. L'expression du CD64 est faible sur les neutrophiles quiescents<sup>94</sup>.

Le FcγRI, comparativement aux FcγRII et FcγRIII est un récepteur de haute affinité, qui lie préférentiellement l'IgG1, l'IgG3 et les IgG en agrégats<sup>93</sup>. À l'état normal, les récepteurs FcγRI sont liés par des IgG monomériques circulants dans le sang qui sont ensuite déplacés par de gros complexes ou par plusieurs petits complexes immuns<sup>90</sup>. Ceci déclenche la phagocytose ainsi que le burst oxydatif<sup>91</sup>. Notamment, l'expression du CD64 sur les neutrophiles corrèle avec leur capacité de lyse bactérienne suite à la phagocytose<sup>96</sup>. L'avidité du CD64 pour les complexes immuns peut être modulée par diverses cytokines, processus appelé « inside out signalling »<sup>90</sup>.

Le CD64 est un marqueur bien connu d'infection et de sepsis<sup>93, 97</sup>, et permet également de différencier une atteinte reliée à une maladie inflammatoire auto-immune (polyarthrite rhumatoïde, lupus, vasculite) d'une infection<sup>93</sup>.

### 3.2 Dysfonction neutrophilique en maladie de Crohn

Le débat persiste concernant le rôle des neutrophiles dans la pathogenèse de la maladie de Crohn. L'hypothèse de l'immunodéficiences est fondée sur plusieurs concepts issus d'expériences *in vitro* et *in vivo* impliquant les neutrophiles et les macrophages d'individus atteints de maladie de Crohn<sup>13, 14, 98, 99</sup>. D'abord, on évoque un recrutement inefficace des neutrophiles en réponse au bris de la barrière épithéliale et à l'infiltration de pathogènes<sup>14, 98, 99</sup>. Une étude *in vivo* a démontré une diminution du recrutement des neutrophiles et un retard d'élimination des fragments de *E. coli* injectés au niveau de l'avant-bras chez des individus connus avec maladie de Crohn<sup>99</sup>. Certains auteurs ont proposé une diminution relative de la production et de la concentration d'IL-8 au sein de la muqueuse, dont le rôle est de recruter les neutrophiles, tout en réfutant l'hypothèse d'une insensibilité du neutrophile à l'IL-8<sup>14 12</sup>. Une dysfonction des macrophages résidents fut également proposée pour expliquer ce faible recrutement des neutrophiles; en effet, une plus faible relâche d'IL-8 et de TNF $\alpha$  par les macrophages en milieu inflammatoire, potentiellement en raison d'une dégradation intracellulaire précoce de ces molécules, fut observée<sup>14, 99</sup>. Toutefois, plusieurs études ont tout de même démontré par diverses techniques une concentration accrue d'IL-8 au sein de la muqueuse inflammée en maladie de Crohn<sup>100</sup>. En plus de son rôle dans le recrutement des neutrophiles, l'IL-8 retarderait l'apoptose des neutrophiles en maladie inflammatoire intestinale<sup>67 101</sup>.

Plusieurs études se sont intéressées au burst oxydatif et aux capacités bactéricides des neutrophiles<sup>13, 96</sup>. Les neutrophiles d'individus atteints de maladie de Crohn colique démontraient *in vitro* une production de superoxide en réponse au phorbol myristate acetate (PMA) et au fMLP plus faible que ceux des contrôles sains<sup>13</sup>. Cette diminution du burst oxydatif pourrait être reliée à une réduction de la concentration du calcium intracellulaire<sup>13</sup>. Une diminution de la lyse bactérienne fut également associée à la présence d'anticorps anti-GM-CSF<sup>96</sup>. Cette incapacité des neutrophiles à éliminer les pathogènes engendrerait des réponses

secondaires des macrophages qui stimulent une réponse immunitaire adaptative (lymphocytes T) , via la production de cytokines proinflammatoires dont l'IL-6 <sup>14, 102, 103</sup>.

Bien que nous ayons énuméré certains mécanismes par lesquels les neutrophiles pourraient être anormalement recrutés ou dysfonctionnels en maladie de Crohn, il est intéressant de noter que certaines mutations génétiques causant une neutropénie ou altérant une fonction particulière du neutrophile peuvent engendrer un tableau clinique, endoscopique et histologique identique à celui de la maladie de Crohn, telles que la granulomatose septique chronique (mutations associées à une dysfonction de l'enzyme NADPH oxydase (burst oxydatif)), mais également la glycogénose type 1b (diminution de la production de NADPH (burst oxydatif)), le syndrome de déficit d'adhésion des leucocytes (mutation de l'intégrine CD18 (adhésion)), les syndromes Chediak-Higashi et Hermansky-Pudlak (anomalies du transport intracellulaire des enzymes) ainsi que plusieurs types de neutropénies (congénitale, cyclique, auto-immune) <sup>69, 75, 103</sup>.

### *3.3 Évaluation des neutrophiles et de leur activation en maladie de Crohn*

En plus des critères histologiques établis d'inflammation active impliquant la présence de polymorphonucléaires au sein de l'épithélium et des cryptes intestinales <sup>10, 30</sup>, plusieurs autres modalités ont corroboré qualitativement et quantitativement la présence de neutrophiles au sein de la muqueuse inflammée en maladie de Crohn. Une des premières techniques utilisées est le marquage des neutrophiles à l'Indium-111, qui fut abandonnée au profit de la coloscopie et de la calprotectine fécale <sup>104-106</sup>.

Plus récemment, Pelletier et collègues, ainsi que Kvedaraite et collègues ont identifié par microscopie confocale et par cytométrie de flux respectivement une infiltration accrue de neutrophiles CD15<sup>+</sup> au niveau de biopsies d'intestins d'individus atteints de maladie de Crohn

<sup>15, 16</sup>. Lampinen et collègues ont utilisé la cytométrie de flux et l'immunohistochimie pour évaluer les neutrophiles et eosinophiles au sein de la muqueuse d'individus avec maladie de Crohn ou colite ulcéreuse. Ils ont identifié une expression accrue des neutrophiles au sein de la muqueuse rectale d'individus avec la maladie de Crohn active comparativement à ceux en rémission endoscopique et aux contrôles sains. De plus, la stratégie d'identification des neutrophiles par cytométrie de flux incluait le CD15<sup>+</sup> et CD66b<sup>+</sup>, ce qui a permis d'établir que l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques, évaluée par « mean fluorescence intensity », était significativement plus forte en maladie active qu'en rémission endoscopique<sup>107</sup>. Également par immunohistochimie et cytométrie de flux, Zhou et collègues ont démontré une fréquence accrue de neutrophiles CD66b+CD177+ au sein de la lamina propria de la muqueuse inflammée comparativement aux contrôles sains <sup>108</sup>.

Le CD66b est considéré comme un marqueur de neutrophiles activés en maladies inflammatoires intestinales et en polyarthrite rhumatoïde <sup>107, 109</sup>. Tel que mentionné précédemment, son expression sur les neutrophiles est majorée en maladie active autant en maladie de Crohn qu'en colite ulcéreuse <sup>107</sup>. Le CD66b pourrait toutefois aussi être un marqueur de dysfonction neutrophilique, son expression étant associée à une diminution de l'activité phagocytaire *in vitro* <sup>110</sup>. On ignore donc si son expression sur les neutrophiles circulants ou coliques varie en fonction de la sévérité de la maladie de Crohn.

En maladies digestives, l'évaluation de l'expression du CD64 sur les granulocytes circulants permet de différencier les intolérances alimentaires des infections entérocoliques, ainsi que des maladies inflammatoires intestinales actives et quiescentes <sup>111</sup>. La fluorescence émise par les anticorps liés au CD64 sur les granulocytes circulants et évaluée par un logiciel en cytométrie de flux a permis d'établir un seuil de 10 000 pour distinguer les entérocolites bactériennes <sup>111</sup>. En maladie de Crohn adulte, l'expression du CD64 est corrélée avec l'activité clinique de la maladie de Crohn ainsi qu'avec la protéine C réactive <sup>111</sup>. Dans une cohorte pédiatrique incluant des individus avec maladie active et inactive, son expression sur les

polymorphonucléaires a été corrélée positivement à la sévérité endoscopique, évaluée par le SES-CD <sup>112, 113</sup>. On ignore toutefois si cette corrélation serait maintenue en évaluant l'expression du CD64 spécifiquement sur des neutrophiles et ce, dans une cohorte adulte avec différents traitements et phénotypes de maladie.

En résumé, les neutrophiles sont présents au sein de la muqueuse inflammée, mais leur rôle dans cette inflammation demeure incertain, tout comme les implications de leur expression du CD66b et du CD64. L'utilisation de plus en plus courante de nouvelles techniques de caractérisation cellulaire nous incite à évaluer à l'aide d'une méthode contemporaine de « single-cell analysis » la corrélation entre leur fréquence dans le sang et les tissus, leur état d'activation et la sévérité de la maladie évaluée avec un score dédié à la maladie de Crohn.

## 2.2 Éosinophiles

### *2.2.1 Généralités et propriétés en inflammation*

Les éosinophiles constituent moins de 5% des leucocytes circulants <sup>114</sup>. Leur temps de demi-vie dans la circulation sanguine est d'environ 8 à 18 heures <sup>65</sup>. Leur développement, leur relâche en circulation ainsi que leur activation est surtout médiée par l'IL-5, mais également par l'IL-3 et le GM-CSF <sup>65, 114, 115</sup>.

Ils ont plusieurs propriétés pro-inflammatoires, notamment par la relâche de protéines cytotoxiques contenues dans leurs granules et par la production de superoxydes, de leucotriènes et de cytokines <sup>114, 116</sup>. Les éosinophiles comptent quatre types de granules : les granules primaires, les granules secondaires (ou spécifiques), les petites granules amorphes et les vésicules sécrétrices. Les principaux constituants des granules sont les cristaux Charcot-Leyden et les « protéines cationiques majeures », dont les « major basic proteins » MBP-1 et

MBP-2. Le MBP-1 est également présent dans les basophiles alors que le MBP-2 est spécifique aux éosinophiles<sup>65, 116</sup>. Leur rôle est d'augmenter la perméabilité membranaire de leur cible en interagissant avec les protéines cationiques de cette membrane<sup>65</sup>. L'« eosinophil peroxidase » (EPO ou EPX) catalyse l'oxydation du NO et forme des produits oxydants qui sont toxiques pour les cellules<sup>65</sup>. La protéine cationique eosinophilique (ECP) et la neurotoxine dérivée de l'eosinophile (EDN) sont également des composés des granules secondaires spécifiques dont le rôle est de créer des pores dans la membrane des pathogènes<sup>65, 116</sup>. Plusieurs médiateurs et cytokines sont également préformés dans les granules et relâchés lors de la dégranulation (TGF- $\beta$ , GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 et TNF $\alpha$ ), et certains sont impliqués dans l'immunité Th2 (IL-4, IL-5)<sup>114, 116, 117</sup>. Les éosinophiles peuvent d'ailleurs produire du GM-CSF, possiblement entre autres en réponse à l'IFN $\gamma$ ; par ce mécanisme, les eosinophiles tissulaires se maintiennent en état d'activation et prolongent leur survie<sup>114, 118</sup>.

L'eotaxin-1 est une chimiokine spécifique aux eosinophiles, produite par les cellules mononucléées de la lamina propria, mais également les éosinophiles<sup>116, 119</sup>. Elle est le ligand du récepteur CCR3 et est essentielle au recrutement des eosinophiles dans le tube digestif<sup>114-116, 119</sup>. L'IL-5, produite entre autres par les Th2 et les ILC-2, est accrue en présence d'inflammation et contribue au recrutement des eosinophiles, entre autre en augmentant leur réponse à l'eotaxin<sup>114, 120, 121</sup>. Le TNF $\alpha$  aurait également un rôle dans l'infiltration eosinophilique en potentialisant l'adhésion de l'eosinophile à l'endothélium<sup>122</sup>. Les eosinophiles expriment plusieurs molécules d'adhésion, notamment l'intégrine  $\alpha 4 \beta 7$ , dont les interactions avec MadCAM-1 permettent le recrutement dans la muqueuse du petit intestin, l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  et les intégrines  $\beta 2$  étant plus spécifiques à la migration dans le colon<sup>116, 121</sup>. Parmi ces dernières, le CD11b/CD18 pourrait également avoir un rôle dans l'activation et la dégranulation des eosinophiles<sup>85</sup>.

Les eosinophiles tissulaires sont des cellules résidentes du tube digestif à l'exception de l'œsophage<sup>114, 116</sup>; de fait, leur présence dans l'épithélium de cet organe présume une



condition pathogénique, les plus fréquentes étant le reflux gastro-oesophagien et l'oesophagite éosinophilique <sup>123</sup>. La fréquence des éosinophiles dans la muqueuse colique à l'état normal est variable selon le segment colique évalué et est significativement plus élevée au niveau du caecum et du colon proximal comparativement au rectum <sup>124-126</sup>. Ils participent à l'homéostasie immunitaire de la muqueuse et leur absence a été associée au dérèglement des fonctions de barrière de la muqueuse avec, entre autres, une diminution significative de la concentration des IgA <sup>114</sup>.

### *2.2.2 Marqueurs d'activation des éosinophiles*

Tel que précédemment détaillé avec les neutrophiles, nous nous sommes intéressés aux rôles du CD66b et du CD64 sur les éosinophiles, qui sont plutôt méconnus en général.

Le CD66b, tout comme le CD66a, est abondamment exprimé sur les éosinophiles circulants des sujets sains <sup>85</sup>. Il est initialement localisé dans des radeaux lipidiques <sup>85</sup>. Son expression est majorée par le fMLP et l'IL-33 <sup>85, 127</sup>. Étant associé au CD11b/CD18, sa stimulation induit l'adhésion de l'éosinophile à l'endothélium ainsi que la production de superoxydes et la dégranulation avec relâche de médiateurs proinflammatoires <sup>85</sup>. Tout comme le CD66b exprimé sur le neutrophile, le galectin-3 compte parmi ses ligands <sup>85</sup>. Son expression sur les éosinophiles évaluée par cytométrie de flux était accrue chez les individus atteints de polyarthrite rhumatoïde comparativement aux contrôles sains <sup>109</sup>. Quant au CD64, il pourrait être exprimé sur les éosinophiles selon certaines sources et son expression serait également stimulée par l'IFN $\gamma$  <sup>128</sup>. Cependant, les méthodes d'analyses visaient l'évaluation de polymorphonucléaires et non celle d'éosinophiles purifiés <sup>129</sup>, nous ne pouvons donc affirmer avec certitude que les éosinophiles expriment ce récepteur d'IgG.

### 2.2.3 Eosinophiles en maladie de Crohn

Les rôles des éosinophiles dans la pathogenèse de la maladie de Crohn demeurent méconnus. Par ailleurs, l'évaluation des eosinophiles tissulaires est difficile en microscopie conventionnelle <sup>114</sup>; leur potentiel de dégranulation pouvant sous-estimer leur degré d'infiltration dans la muqueuse, surtout avec la coloration H & E <sup>116</sup>.

Plusieurs autres techniques ont toutefois permis de démontrer directement ou indirectement la présence d'éosinophiles au sein de la muqueuse inflammée en maladie de Crohn, notamment la cytométrie de flux <sup>107</sup>, l'immunohistochimie<sup>107, 130</sup>, la microscopie de fluorescence <sup>131</sup> ainsi que la détection des granules protéiques eosinophiliques (EGP) au sein de la muqueuse par microscopie électronique, immunohistochimie <sup>116, 117</sup> et quantification des niveaux protéiques dans la lumière intestinale et dans les selles <sup>117</sup>. La concentration accrue d'eotaxin-1 sérique observée en maladie de Crohn témoigne en faveur de leur recrutement <sup>116, 132, 133</sup>. Le fMLP semble également avoir un rôle préférentiel dans la chimiotaxie des eosinophiles en maladie de Crohn comparativement à la colite ulcéreuse et aux individus sains <sup>134</sup>.

Les eosinophiles pourraient donc s'accumuler dans la muqueuse inflammée et soutenir la réponse inflammatoire en relâchant des cytokines proinflammatoires et profibrotiques, des prostaglandines et leucotriènes, ainsi que des protéines cationiques contenues dans leurs granules (ECP, MBP, EPO) <sup>114, 116, 130, 135</sup>. Les eosinophiles circulants d'individus atteints de maladie de Crohn relâcheraient d'ailleurs davantage d'ECP en expérimentation *in vitro* en présence de maladie active comparativement à ceux en rémission clinique <sup>136</sup>. Cette capacité de production et relâche d'ECP était également corrélée à la sévérité clinique de la maladie selon le Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI). De plus, on a récemment suggéré que les éosinophiles présents dans la muqueuse inflammée d'individus atteints de la maladie de Crohn et de colite ulcéreuse pourraient produire un inhibiteur de l'IL-22, l'IL-22BP, leur

conférant un rôle pathogénique compte tenu que l'IL-22 aurait pour fonctions, selon plusieurs modèles murins, de stimuler la production de mucus, de renforcer les jonctions serrées, de promouvoir la guérison muqueuse en augmentant la survie et la prolifération des cellules épithéliales <sup>137</sup>. Certaines évidences évoquent également un rôle des eosinophiles dans l'initiation de l'inflammation, entre autres, en raison de leur présence ainsi que de celle de l'IL-5 au sein de la muqueuse inflammée lors de récurrences précoces, trois mois suivant la résection chirurgicale <sup>138</sup>. De plus, leur présence au sein de la lamina propria de la muqueuse d'individus en rémission pourrait être prédicteur de rechute <sup>139</sup>.

En plus d'un rôle dans l'inflammation muqueuse, les eosinophiles pourraient également avoir une implication dans la maladie de Crohn sténosante, entre autres, en favorisant l'activation des fibroblastes<sup>116, 140</sup>. En effet, leur présence, indiquée par l'EPO en immunohistochimie, a été corrélée au degré de fibrose au sein de spécimens chirurgicaux de sténoses iléales et de biopsies iléales d'enfants avec maladie de Crohn <sup>140</sup>. Leur production et relâche de TGF- $\beta$ , mais également d'IL-13, pourraient contribuer au processus fibrotique <sup>116, 140, 141</sup>.

On observe par contre une certaine dualité dans l'implication des eosinophiles dans le processus inflammatoire et les rôles du TGF- $\beta$  qu'ils produisent. De fait, le TGF- $\beta$  aurait également des rôles anti-inflammatoires et contribueraient au maintien de l'homeostasie de la muqueuse et à renforcer les jonctions serrées <sup>116, 142, 143</sup>, expliquant possiblement la présence et activation des eosinophiles au sein de la muqueuse d'individus avec une maladie quiescente<sup>107, 115</sup>. On a également démontré dans un modèle expérimental murin que l'absence d'eosinophiles entraîne une colite neutrophilique importante avec significativement moins de médiateurs anti-inflammatoires <sup>144</sup>.

L'association directe et indirecte entre la présence d'eosinophiles tissulaires et la maladie inflammatoire active<sup>117</sup>, ainsi que les corrélations contradictoires entre l'expression du CCR3

et du CD69 (marqueur d'activation <sup>107</sup>) sur les éosinophiles circulants et la sévérité clinique de la maladie au sein d'une cohorte adulte <sup>132</sup> nous incitent à évaluer simultanément la corrélation entre la fréquence des éosinophiles circulants et tissulaires et la sévérité de la maladie de Crohn. De plus, bien que l'IL-33, identifié dans la muqueuse d'individus avec une maladie inflammatoire active <sup>140, 145</sup>, puisse contribuer à l'expression du CD66b sur les éosinophiles <sup>127</sup>, la présence de cette glycoprotéine de surface et son association avec la sévérité de la maladie demeurent inconnues en maladie de Crohn, tout comme celles du récepteur CD64.

## 2.3 Basophiles et mastocytes

### 2.3.1 Généralités et propriétés en inflammation

Les basophiles comptent pour moins de 1% des leucocytes circulants <sup>146</sup>. Ils semblent conditionnés pour des fonctions différentes selon que leur production ait été induite par l'IL-3 comparativement au TSLP <sup>147</sup>. En effet, le TSLP est associé à la formation de basophiles impliqués davantage dans l'immunité innée que régulés par l'IgE.<sup>147</sup> Ils sont recrutés dans les tissus inflammés par l'action de l'histamine, la prostaglandine D2 et l'IL-3<sup>146</sup>. Ils adhèrent à l'endothélium vasculaire par l'intégrin CD11b/CD18 dont l'expression est également induite par l'IL-3<sup>147</sup>. De plus, comme les autres granulocytes exprimant le FPR-1, les basophiles peuvent être activés au contact du fMLP bactérien <sup>147, 148</sup>. Une fois activés, ils produisent des médiateurs lipidiques proinflammatoires, les leucotriènes B4 et C4, le « platelet activation factor », des cytokines (telles que IL-4, IL-6, IL-13, TNF $\alpha$ , TSLP et GM-CSF) ainsi que des peptides antimicrobiens <sup>147, 149</sup>. Leurs granules cytotoxiques contiennent des MBP et cristaux Charcot Leyden, communs aux granules des éosinophiles, du granzyme B, ainsi que de l'histamine <sup>65</sup>. Les basophiles expriment des récepteurs pour l'IgE (Fc $\epsilon$ RI) dont la liaison stimule rapidement la relâche d'histamine <sup>146</sup>. Leurs interactions avec les lymphocytes B, les divers sous-types de lymphocytes T, notamment l'immunité Th2, ainsi qu'avec les ILC dans des conditions allergiques et inflammatoires sont multiples et surpassent l'objectif du présent

travail, tout comme les interactions entre les mastocytes et les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes B et T <sup>65, 146, 147</sup>.

Les mastocytes sont des cellules résidentes dans diverses muqueuses; on considère qu'ils constituent 2 à 3% des cellules de la lamina propria de la muqueuse intestinale <sup>150</sup>. Leur survie se compte en mois <sup>65</sup>. On distingue les mastocytes de la muqueuse et ceux du tissu conjonctif<sup>65</sup>. On peut également les sous-diviser en « tryptase only MC », « chymase-only MC » et de « tryptase and chymase MC », selon leur production enzymatique <sup>65</sup>. Au niveau du tube digestif, les « tryptase-only MC » sont dans la muqueuse et les « tryptase and chymase MC », au sein du tissu conjonctif de la sous-muqueuse<sup>65, 151</sup>. Ils intègrent l'intestin par l'interaction entre l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et le MADCAM-1 <sup>65</sup>. Les mastocytes contribuent à réguler le flot sanguin et la perméabilité intestinale, le péristaltisme, les fonctions sécrétrices de la muqueuse, ainsi que les réponses innées et adaptatives, en contribuant au recrutement des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes Th2 aux sites d'infection <sup>150</sup>. Les mastocytes relâchent des granules cytotoxiques dans l'environnement lors de leur activation<sup>65</sup>. Ces granules sont largement constituées de protéoglycans. Ces protéoglycans sont chargés négativement et forment des complexes avec l'histamine et avec des protéases (i.e tryptase, chymase, cathepsin G, carboxypeptidase). <sup>65, 151</sup>

Les mastocytes expriment à leur surface le Fc $\epsilon$ RI, dont la liaison à l'IgE stimule la dégranulation et la relâche d'histamine <sup>151</sup>. D'autres mécanismes peuvent mener à leur activation, impliquant notamment le LPS et l'IL-3 <sup>152</sup>. Une à deux heures après leur activation, ils produisent des prostaglandines D2 et tout comme les basophiles, les leucotriènes B4 et C4 <sup>65, 151</sup>. La prostaglandine D2 contribue au recrutement des éosinophiles et des basophiles <sup>153</sup> et le leucotriène B4 aurait quant à lui un effet chimotactique pour les neutrophiles et les éosinophiles <sup>65, 153</sup>. Les mastocytes produisent plusieurs autres médiateurs incluant le GM-CSF, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8<sup>152</sup>; la production de l'IL-8 est entre autres possible grâce aux effets

combinés du LPS et du CD14 soluble et elle constitue un autre mécanisme potentiel par lequel le mastocyte pourrait recruter des neutrophiles au sein de la muqueuse <sup>154</sup>.

### 2.3.2 Propriétés anti-inflammatoires

Les propriétés anti-inflammatoires des basophiles sont également méconnues et leur étude actuelle est principalement *in vitro* et avec des modèles murins <sup>146</sup>. Lorsqu'activés par l'IL-33, leur production d'IL-4 pourrait avoir une fonction modulatrice sur les macrophages dans des modèles d'arthrite et de dermatite allergique <sup>146, 155, 156</sup>. Ils pourraient également potentialiser l'action des cellules T régulatrices via la production d'amphiregulin <sup>146, 157</sup>.

Les mastocytes ont également un rôle anti-inflammatoire lors de la phase tardive de l'inflammation et ce, à la faveur de plusieurs médiateurs régulateurs tels que le TGF- $\beta$ , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 <sup>65, 152</sup>. Des modèles murins ont démontré un rôle dans le recrutement de Treg FOXP3+ ainsi que dans la tolérance en allogreffe par le fait de la production de GM-CSF, lequel favoriserait la survie de cellules dendritiques contribuant à la tolérance périphérique <sup>158</sup>.

### 2.3.3 Basophiles et mastocytes en maladie de Crohn

Les basophiles sont des cellules difficiles à étudier au sein de la muqueuse colique, leur fréquence étant très faible <sup>145</sup>. Une augmentation de la fréquence des basophiles circulants ainsi que dans la muqueuse colique inflammée d'individus atteints de maladie de Crohn et de colite ulcéreuse a toutefois été démontrée comparativement à des contrôles sains et en comparant des segments coliques pairés inflammés et non inflammés <sup>159</sup>. Cependant, le rôle des basophiles en maladie de Crohn demeure incertain. Leur production de leucotriène B4 pourrait contribuer au recrutement de neutrophiles; toutefois, la sensibilité des neutrophiles envers le leucotriène B4 chez les individus atteints de la maladie de Crohn est controversée <sup>68</sup>.

<sup>160</sup>. Les basophiles produisent également du GM-CSF et de l'IL-8, autre mécanisme stimulant le recrutement et l'activation des neutrophiles <sup>149, 161</sup>. Enfin, les basophiles pourraient interagir avec les cellules T mémoire (T<sub>EM</sub> CCR7+) et stimuler une réponse Th17 et Th17/Th1 <sup>159</sup>. L'histamine qu'ils relâchent semble également jouer un rôle dans la production d'IL-17 par les T<sub>EM</sub> grâce aux récepteurs H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub>, sans pour autant être indépendante des basophiles <sup>145</sup>. Plusieurs études ont d'ailleurs associé la présence d'histamine à l'activité de la maladie de Crohn, une première ayant démontré une corrélation entre l'excrétion de N-méthyl histamine et la sévérité clinique et endoscopique de la maladie <sup>162</sup>, une seconde, une concentration accrue d'histamine au sein de la muqueuse inflammée <sup>163</sup> et une troisième, une relâche significative d'histamine dans le jéjunum d'individus avec maladie de Crohn active <sup>164</sup>, suggérant un rôle de ce médiateur ou de ses sources (soient le basophile et le mastocyte) dans la physiopathologie de la maladie. En plus de stimuler la production d'IL-17 par les T<sub>EM</sub> <sup>145</sup>, ce médiateur pourrait réguler d'autres cellules immunitaires exprimant des récepteurs H, telles que d'autres lymphocytes T, les granulocytes, les mastocytes et les cellules dendritiques <sup>165</sup>. De plus, l'histamine pourrait contribuer à la diarrhée en raison d'une stimulation de la motricité intestinale et de la sécrétion d'eau, de sodium et de chlore par les transporteurs et canaux ioniques épithéliaux <sup>165-167</sup>.

Plusieurs études ont mené à des résultats contradictoires quant à la présence accrue de mastocytes en maladie de Crohn, probablement en raison des techniques utilisées pour leur détection, de leur facilité de dégranulation et du type de prélèvement étudié (biopsies de la muqueuse vs spécimen chirurgical offrant une évaluation de l'ensemble de la paroi intestinale) <sup>135</sup>. Une étude japonaise a démontré une augmentation des mastocytes exprimant la chymase dans la muqueuse d'individus avec la maladie de Crohn comparativement aux contrôles sains, mais n'a établi aucune différence entre les individus avec maladie de Crohn active versus inactive, tout comme deux études récemment publiées comparant des spécimens paires de muqueuse inflammée et non inflammée de même patients <sup>145, 159, 168</sup>. D'autres auteurs ont démontré une augmentation de leur infiltration en tissu fibrotique en

maladie de Crohn et proposé un rôle dans la fibrogenèse en raison entre autres de la production de chymase <sup>150, 152, 169</sup>. De plus, les mastocytes pourraient contribuer à l'inflammation neurogénique en maladie de Crohn via la production de substance P <sup>152</sup>. Il est cependant possible que le niveau d'activité de ces mastocytes et non leur fréquence ait une influence sur l'inflammation. Nous avons précédemment cité plusieurs études démontrant une concentration accrue d'histamine en présence de maladie de Crohn active, et un dernier groupe d'auteurs a même observé une relâche plus importante d'histamine par les mastocytes coliques et intestinaux d'individus atteints de maladie de Crohn comparativement à des contrôles sains<sup>165, 170</sup>.

Il persiste donc plusieurs controverses et incertitudes quand à l'implication des basophiles et mastocytes dans la maladie de Crohn. À notre connaissance, aucune étude n'a corrélé la fréquence des basophiles circulants et coliques, ainsi que des mastocytes avec la sévérité endoscopique de la maladie.

En résumé, la littérature propose plusieurs arguments en faveur de la présence des différentes sous-populations granulocytaires et des mastocytes en maladie de Crohn, ainsi que divers mécanismes de recrutement de ces cellules au sein de la muqueuse inflammée. Cependant, leurs rôles dans la pathogenèse de la maladie demeurent méconnus et on ignore si leur nombre et activation fluctuent en fonction de la sévérité de la maladie, l'évaluation histologique de la maladie de Crohn n'étant pas représentative de la sévérité globale de la maladie. Une évaluation par technique de cytométrie de flux de la présence d'une corrélation entre la fréquence et l'activation des granulocytes circulants et tissulaires et la sévérité de l'atteinte macroscopique de la muqueuse iléocolique permettrait de mieux cerner les acteurs impliqués dans la perpétuation et la progression de l'inflammation de la muqueuse en maladie de Crohn.



## Objectifs de travail

Nous avons posé la question de recherche suivante: y a-t-il une corrélation entre la sévérité de la maladie de Crohn et la fréquence et l'activation des granulocytes circulants et coliques. Cette question infère plusieurs objectifs de travail.

Le premier objectif était de valider notre stratégie d'identification des granulocytes circulants et coliques par cytométrie de flux.

Ensuite, le second objectif de travail était de quantifier, à l'aide de notre méthode d'analyse, les fréquences des granulocytes dans le sang et la muqueuse colique ainsi que les mastocytes tissulaires chez des individus avec maladie de Crohn colique avec activité endoscopique ainsi que des individus en rémission.

Une corrélation étant observée en colite ulcéreuse entre l'infiltration des neutrophiles dans la muqueuse et la sévérité endoscopique de la maladie <sup>60</sup>, le troisième objectif était de déterminer s'il existe une corrélation entre la fréquence de chaque population granulocytaire dans la muqueuse colique et dans le sang et la sévérité clinique et endoscopique de la maladie.

Une corrélation entre l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants et la sévérité endoscopique de la maladie ayant été observée dans une cohorte pédiatrique <sup>112, 113</sup>, notre quatrième objectif était d'évaluer la corrélation entre l'expression de marqueur d'activation à la surface de ces cellules et la sévérité de la maladie. Nous avons préconisé le CD66b, le CD64.

Enfin, le développement de nouveaux biomarqueurs indiquant l'activité et la sévérité de la maladie permettrait une optimisation de la prise en charge des individus atteints de maladie

de Crohn et nous aimerions identifier une combinaison potentielle de paramètres dans le sang et/ou dans la muqueuse qui serait corrélée avec la sévérité de la maladie tissulaire.

Les objectifs secondaires étaient :

- 1) évaluer si le phénotype, le comportement, la localisation de la maladie ou le traitement récent ont un impact sur le profil granulocytaire dans le sang et la muqueuse.
- 2) déterminer s'il existe une corrélation entre les fréquences de chaque sous-population en présence de maladie inflammatoire active.

## Matériels et méthodes

### 1. Participants

Nous avons recruté prospectivement des individus atteints de maladie de Crohn au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal au moment de leur coloscopie entre novembre 2015 et décembre 2017. Nous avons inclus des individus âgés de 18 ans et plus avec maladie de Crohn colique ou iléocolique active ou quiescente. Les participants étaient recrutés soit au moment de leur première évaluation endoscopique, lors d'une exacerbation ou lors d'une coloscopie de suivi pour objectiver la guérison muqueuse ou de surveillance pour le développement de dysplasie. Le diagnostic de maladie de Crohn était ou bien déjà établi, ou confirmé selon les critères standards endoscopiques et histologiques<sup>11, 31</sup>. Nous avons exclus les patients avec possible surinfection intestinale bactérienne ou virale. Bien que notre protocole n'incluait pas la recherche systématique de pathogènes bactériens ou de cytomégalovirus, une culture de selles et recherche de *c. difficile* sont demandées dans la majorité des cas en routine par les gastroentérologues du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal en présence d'une exacerbation aiguë de maladie inflammatoire intestinale, ainsi qu'une recherche histologique et culture virale pour le cytomégalovirus en présence d'exacerbation sous corticostéroïdes ou antiTNF. Par ailleurs, tout patient avec apparence endoscopique atypique pour une colite de Crohn ou biopsies ne démontrant qu'une inflammation active sans signe de chronicité furent exclus. Nous avons également exclus les individus atteints d'une autre condition auto-immune du tube digestif (cholangite sclérosante primaire, cholangite biliaire primitive, maladie coeliaque), ainsi que ceux avec maladie iléale isolée (L1 selon la classification de Montreal<sup>17</sup>) ou évaluation endoscopique incomplète.

Nous avons établi notre recrutement selon l'activité de la maladie et le traitement du dernier mois. Nous avons donc considéré 5 groupes, c'est-à-dire 1) individus au moment du diagnostic 2) individus avec maladie active sans traitement dans le dernier mois 3) individus avec maladie

active malgré traitement non biologique (5ASA, immunomodulateurs, prednisone) 4) individus avec maladie active malgré traitement biologique (anti-TNF seul ou en combinaison avec un immunomodulateur) 5) individus en rémission clinique et endoscopique. Un groupe contrôle, constitué d'individus asymptomatiques au niveau gastrointestinal se présentant pour une coloscopie de dépistage pour le cancer colorectal ou surveillance de polypes coliques, fut également formé.

## *2. Considérations éthiques*

Le consentement libre et éclairé écrit fut obtenu de tous les participants. Le comité d'éthique de la recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal a approuvé le protocole et cette étude est conforme à la Déclaration d'Helsinki.

## *3. Caractérisation de la maladie*

Nous avons choisi l'index Harvey Bradshaw (HBI) (**Annexe III**) pour l'évaluation clinique<sup>34</sup>, et le Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) (**Annexe V**) pour l'évaluation endoscopique de la maladie<sup>40</sup>. Ce score fut récemment recommandé comme score à préconiser dans les essais cliniques avec des seuils validés pour la réponse et la rémission endoscopique<sup>171, 172</sup>. Tel qu'actuellement défini dans la littérature, nous avons considéré un SES-CD >2 comme maladie endoscopique active, alors que la rémission endoscopique correspond à un SES-CD 0-2<sup>37</sup>. Étant donné que nous désirons évaluer le profil cellulaire immunitaire selon l'apparence endoscopique, nous avons considéré les individus avec SES-CD 1 or 2 non complètement dépourvus d'inflammation et avons donc isolé les patients avec guérison muqueuse complète (SES-CD = 0) pour les comparer aux patients avec maladie active<sup>139, 173</sup>. Les scores furent calculés prospectivement au moment de l'iléocoloscopie.

Nous avons observé deux phénotypes endoscopiques distincts. D'abord, la majorité des participants présentait des lésions endoscopiques typiques de maladie de Crohn, telles que des ulcères creusant bien définis ou serpigneux entrecoupés de muqueuse saine<sup>31</sup>. Toutefois, certains patients avaient une présentation endoscopique s'apparentant à la colite ulcéreuse (« UC-like », colite superficielle de Crohn)<sup>18, 28, 29</sup>. Malgré des signes endoscopiques caractéristiques de la colite ulcéreuse, tels qu'une inflammation continue avec érythème, friabilité, saignements spontanés, plusieurs éléments chez ces patients nous permettaient de maintenir un diagnostic de maladie de Crohn. Parmi ces caractéristiques, on compte une maladie de Crohn intestinale concomittante, une iléite aphteuse, une maladie périanale, une atteinte colique segmentaire ou isolée au niveau du colon proximal, mais non typique de la présentation avec « caecal patch » décrite en colite ulcéreuse<sup>26</sup>, une épargne du rectum au moment du diagnostic ou sans traitement récent et la présence de granulomes non associés à des cryptes rupturées ou d'iléite chronique lors de l'évaluation histologique<sup>18, 28, 29</sup>.

Enfin, l'âge au début de la maladie, la localisation, le comportement et la présence de maladie périanale ont été recueillis selon la Classification de Montréal (**Annexe I**)<sup>17</sup>.

## Méthode expérimentale

### *1. Sang*

Trois millilitres (mL) de sang ont été prélevés au moment de l'iléocoloscopie. Afin d'isoler les leucocytes, nous avons procédé à une lyse des globules rouges avec ACK lysis buffer (BioWhittaker Lysing Buffer, Lonza) puis centrifugation et lavage avec un milieu de Hanks (HBSS, Sigma-Aldrich). Nous avons ainsi obtenu des suspensions contenant entre 1 et 16 millions de cellules.

## 2. Digestion tissulaire

Nous avons prélevé au moment de la coloscopie huit à dix biopsies de la zone colique la plus sévèrement atteinte, ou au niveau du caecum en présence d'une rémission endoscopique ou d'un contrôle sain. Les biopsies ont été conservées dans un milieu RPMI 1640 (Wisent) avec du serum fetal bovin (Wisent) (concentration 10%) et une combinaison d'antibiotiques (concentration 1%), incluant de la pénicilline 100UI/mL et de la streptomycin 10000ug/mL (Wisent), dilution x 100. Nous avons d'abord procédé à une digestion chimique avec du DTT 1mM (Sigma-Aldrich) et EDTA 1mM (Sigma Aldrich) dans un incubateur à 37 degrés pour 45 minutes, suivie d'une digestion enzymatique avec DNase I 0.01mg/mL (Roche) et collagénase D 0.25mg/mL (Roche) dans un incubateur à 37 degrés pour 45 minutes. Une dissociation mécanique avant et après la digestion enzymatique fut effectuée avec un gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) <sup>174</sup>. Nous avons obtenu par cette technique des suspensions cellulaires comprenant entre 400 000 et 3 millions de cellules .

## 3. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique de *single-cell analysis* permettant l'identification individuelle des cellules d'une suspension s'écoulant par un mince jet liquidien et traversant un jeu de lasers. D'une part, un photodétecteur (forward scatter signal, FSC) permet d'évaluer la distribution de taille des cellules alors qu'un autre photodétecteur (side scatter signal, SSC) permet d'estimer la granularité des cellules par diffraction de la lumière. Ensuite, l'ajout à la suspension cellulaire d'anticorps spécifiques liés à des fluorophores (excités par des longueurs d'onde précises de laser) permet l'identification de protéines exprimées à la surface des cellules et ainsi, distinguer les différentes sous-populations cellulaires <sup>2\*</sup>.

---

<sup>2\*</sup> Manuel de l'utilisateur du BD FACS Aria II, Becton, Dickinson and Company, Mars 2009, Chapitre 2 p. 27-34.

La première étape fut d'exclure les cellules mortes en procédant à une coloration « Live/Dead » (Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit Invitrogen Thermo Fisher Scientific). Cette première analyse est nécessaire car lorsque la cellule est en apoptose, la membrane cellulaire devient perméable et permet l'entrée dans la cellule des anticorps utilisés en cytométrie de flux et leur liaison avec des molécules intracellulaires, ce qui pourrait fausser les analyses. Le principe de la technique utilisée est d'évaluer la liaison entre un colorant réagissant avec des groupement amines présents à la surface et à l'intérieur de la cellule et permet une fluorescence qui est très intense lorsque la membrane cellulaire est perméable, amenant le colorant à être abondamment lié au contenu intracellulaire <sup>3\*</sup>.

Chaque suspension cellulaire fut ensuite combinée à une des deux combinaisons d'anticorps fluorescents ainsi qu'à des IgG humain ayant pour but de bloquer les récepteurs Fc, étape nécessitant de laisser reposer pendant 30 minutes à 4°C. Les anticorps suivants ont été utilisés:

Combinaison #1 :

- FITC anti-CD64 (10.1) (BioLegend)
- Brilliant Violet™ anti-CD15 (W6D3) (BioLegend)
- Pacific blue™ anti-CD66b (G10F5) (BioLegend)
- PE anti-CD9 (HI9a) (BioLegend)
- PE anti- FcεRIα (AER-37) (Thermo Fisher Scientific)
- APC-H7 anti-CD45 (2D1) (Becton Dickinson)

---

<sup>3</sup> \* Informations du fabricant Invitrogen Thermo Fisher Scientific, site internet <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L34965> accédé le 18 avril 2018

Combinaison #2 :

- FITC anti-Lineage (CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD56) (UCHT1, HCD14, 3G8, HIB19, 2H7, HCD56) (BioLegend)
- FITC anti-MHC class II (ID Labs Inc)
- PerCP/Cy5.5 anti-CD294 (BM16) (BioLegend)
- PeCy7 anti-172a/b (SE5A5) (BioLegend)
- Pacific blue™ anti-FcεRIα (AER-37) (BioLegend)
- PE anti-CD193 (5E8) (BioLegend)
- APC anti-CD117 (104D2) (BioLegend)
- Alexa Fluor® 700 anti-CD45 (2D1) (R&D Systems)

Entre 250 000 and 1 million de cellules du sang et de la muqueuse ont été associées à chaque combinaison d'anticorps. Au total, 100 000 cellules par suspension ont été analysées avec un appareil BD FACS Aria II (BD Biosciences).

Justification du choix des anticorps pour l'identification des sous-populations granulocytaires

En premier lieu, le CD45 est important pour l'évaluation des cellules obtenues suite aux digestions de la muqueuse colique, étant présent uniquement sur les cellules hématopoïétiques et permettant donc de les discriminer des cellules épithéliales incomplètement digérées <sup>175</sup>.



## 1. Neutrophiles et éosinophiles

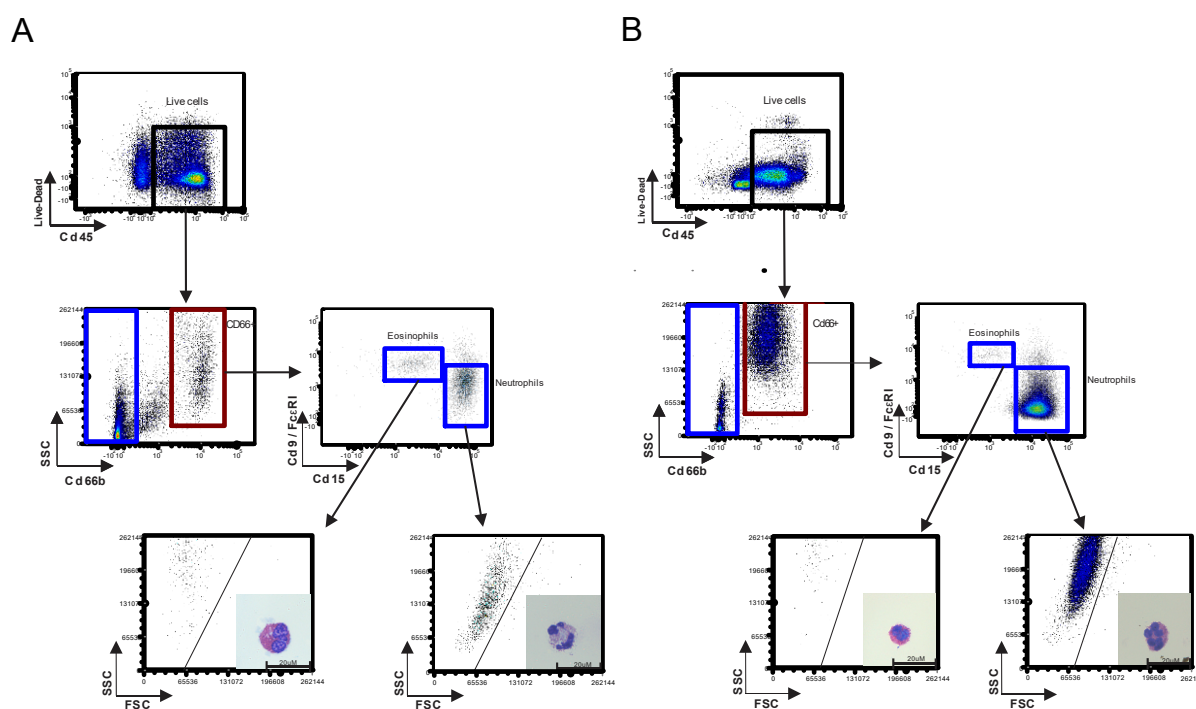
Les neutrophiles ont été identifiés comme étant CD45<sup>+</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD9<sup>-</sup> FcεRI<sup>-</sup> et les éosinophiles CD45<sup>+</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>dull</sup> CD9<sup>+</sup>/FcεRI<sup>+</sup>. Les neutrophiles sont des cellules avec forte granularité (SSC élevé) et expriment le CD15, ainsi que le CD66b <sup>65</sup>. Ces marqueurs ont été précédemment utilisés pour identifier les neutrophiles dans le sang et la muqueuse d'individus avec maladie de Crohn <sup>16, 107</sup>. Le CD15 peut toutefois être également exprimé sur les éosinophiles et les monocytes <sup>175</sup>. Nous avons ajouté le CD9, exprimé sur les éosinophiles et non sur les neutrophiles, et précédemment utilisé pour l'identification des éosinophiles <sup>107, 109, 118</sup>. Le FcεRI fut également ajouté, car il pourrait être exprimé sur les éosinophiles chez l'Homme <sup>176</sup>, son expression sur les neutrophiles semble minimale et uniquement chez certains asthmatiques et il permettrait de surcroît d'exclure une contamination potentielle des neutrophiles par des basophiles ou des mastocytes <sup>177</sup>. Enfin, les éosinophiles présentent également une forte granularité (SSC) et expriment le CD66b <sup>85, 109, 114</sup>.

## 2. Basophiles et mastocytes

Les basophiles sanguins étaient CD45<sup>+</sup> SSC<sup>low</sup> HLADR<sup>-</sup> Lineage<sup>-</sup> CRTH2<sup>+</sup> CCR3<sup>+</sup> c-kit<sup>-</sup> CD172a<sup>low</sup> FcεRI<sup>high</sup> et ceux de la muqueuse étaient CD45<sup>+</sup> SSC<sup>low</sup> Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>-</sup> CD172a<sup>low</sup> c-kit<sup>-</sup> FcεRI<sup>+</sup>. Les mastocytes étaient CD45<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> Lineage<sup>dull</sup> HLADR<sup>dull</sup>. Les basophiles expriment le FcεRI, le CRTH2 (récepteur de prostaglandine) et le CCR3 (récepteur de l'eotaxin) <sup>65, 146, 147</sup>. Tout comme les mastocytes, ils sont dépourvus du CD14, CD16 et CD19 <sup>65</sup>. Les mastocytes expriment également le FcεRI, mais se distinguent par leur expression du CD117 (c-kit) <sup>65, 149</sup>. Nous avons donc utilisé un lineage (CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD56) ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité classe II (MHCII) dont ils sont exempts pour isoler les basophiles et les mastocytes et exclure certaines cellules dendritiques qui pourraient également exprimer le FcεRI <sup>65, 145, 146</sup>.

## Confirmation morphologique

Nous avons confirmé l'identification des neutrophiles et éosinophiles du sang et de la muqueuse par notre combinaison d'anticorps en triant ces cellules avec l'appareil FACS BD ARIA II (BD Biosciences) et en procédant à leur évaluation morphologique sur lame suite à une centrifugation cytopspin et coloration Giemsa-Wright (**Figure 1**). L'identification des basophiles et mastocytes s'est appuyée sur des études publiées antérieurement <sup>145, 159</sup>.



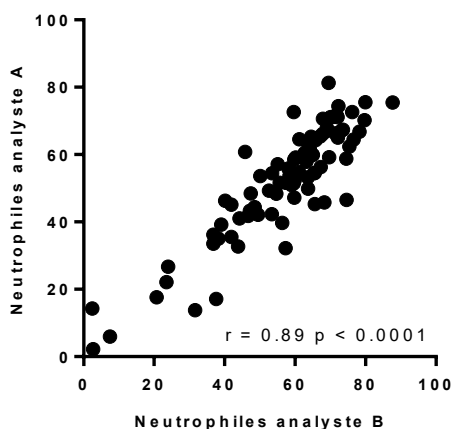
**Figure 1. Stratégie de tri des cellules par cytométrie de flux et identification morphologique des neutrophiles et éosinophiles.**

A) Eosinophiles et neutrophiles issus de la muqueuse colique inflammatoire. B) Eosinophiles et neutrophiles circulants. Les éosinophiles étaient donc  $CD45^+$  Live/Dead<sup>neg</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>dull</sup> CD9<sup>+</sup>/FcεRI<sup>+</sup> et les neutrophiles étaient  $CD45^+$  Live/Dead<sup>neg</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD9<sup>-</sup> FcεRI<sup>-</sup>. Coloration Giemsa-Wright. L'échelle représente 20µm.

## Analyse des données

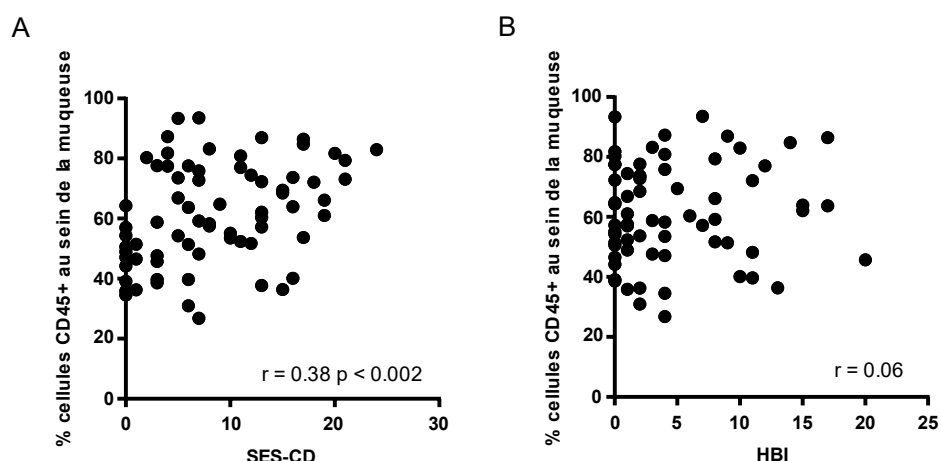
### 1. Fréquences cellulaires

Les analyses furent effectuées avec le logiciel FCS Express 4 flow software (De Novo Software, California USA). Chaque analyse quant à la fréquence des granulocytes observés fut effectuée en parallèle par un observateur indépendant, aveugle du statut clinique des participants. La comparaison ultérieure des résultats des deux observateurs a démontré une reproductibilité acceptable (**Figure 2**).



**Figure 2. Corrélation entre les fréquences des neutrophiles circulants observées par chacun des analystes.**  
Coefficient de corrélation de Pearson, n = 73.

Compte tenu que nous désirons évaluer la composition de l'infiltrat inflammatoire granulocytaire et que, malgré les techniques de digestion, il persiste des cellules épithéliales dans les suspensions cellulaires, nous avons d'abord évalué s'il y avait une corrélation entre la fréquence des cellules hématopoïétiques (CD45+) et la sévérité de la maladie (**Figure 3**). La fréquence des cellules hématopoïétiques était corrélée à la sévérité endoscopique (**Figure 3A**) mais non à la sévérité clinique (**Figure 3B**). Pour éviter que ce paramètre influence la corrélation entre la composition de l'infiltrat inflammatoire et la sévérité endoscopique, nous allons considérer la fréquence des granulocytes observés par rapport à la population de cellules CD45+/live dead<sup>neg</sup> et non l'ensemble des cellules analysées avec le FACS.



**Figure 3. Corrélation entre la fréquence des cellules hématopoïétiques dans la muqueuse colique et la sévérité de la maladie.**

A) selon le SES-CD et B) selon le HBI. Coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 73$ .

## 2. Mean fluorescence Intensity

Nous avons utilisé la « Mean Fluorescence Intensity » (MFI) pour quantifier l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles et eosinophiles. Les valeurs de MFI ont été obtenues avec le logiciel FCS Express 4 flow software (De Novo Software, California USA). La MFI se définit comme la moyenne de l'intensité de la fluorescence émise par chaque cellule d'une

population, en regard d'un fluorophore spécifique associé à un anticorps lié à une protéine de surface. Elle représente donc le degré d'expression de l'antigène de surface d'intérêt sur la cellule. À l'aide du logiciel FCS Express 4, nous avons obtenu les moyennes arithmétiques des valeurs exprimées.

### *3. Analyses statistiques*

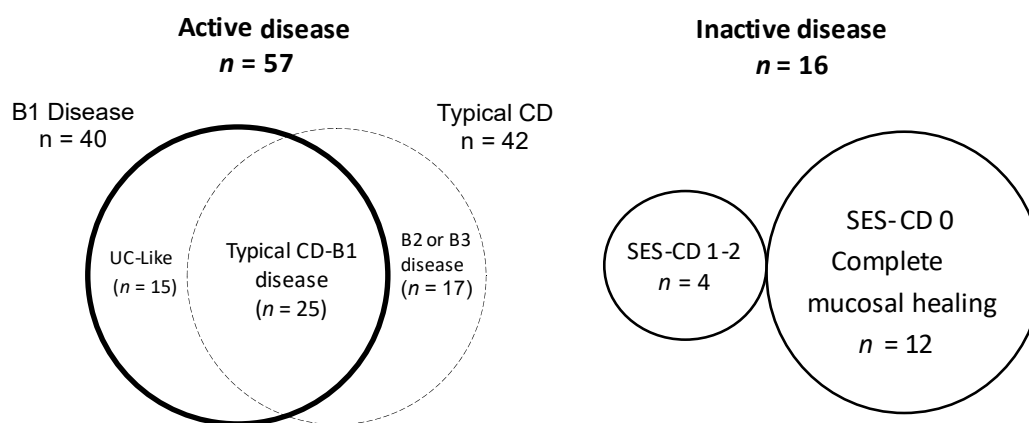
Nous avons d'abord vérifié la distribution de notre cohorte avec le test D'Agostino-Pearson. Une distribution normale fut observée pour le SES-CD des individus avec maladie active. Des coefficients de corrélation de Pearson furent calculés pour évaluer la cohorte entière, ainsi que des coefficient de Spearman pour les sous-groupes inférieurs à 30 individus. Le test de Kruskal-Wallis, suivi du test de comparaison multiple de Dunn furent effectués lorsque plus de deux groupes non appariés étaient comparés. Les médianes furent comparée avec le test U de Mann-Whitney lorsque deux groupes n'étaient pas appariés, alors que le test de Wilcoxon fut utilisé pour les paires. À moins de précisions contraires, les résultats sont présentés sous la forme de médiane avec écart interquartile. Enfin, des « Receiver Operating Characteristic curves » (ROC curves) ont été produites. L'intervalle de confiance ("Exact Binomial Confidence Interval") et la déviation standard des aires sous la courbes ont été calculés, ainsi que des comparaisons paires à l'aide du test DeLong avec le logiciel MedCalc version 18. L'index de Youden fut calculé pour établir les seuils en fonction des courbes ROC et les valeurs de sensibilité et spécificité sont présentées. Les autres analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism version 7.03 (La Jolla, California USA). Une valeur p inférieure à 0.05 a été considérée comme étant statistiquement significative (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001).

# Résultats

## Description de la cohorte de participants

### 1. Caractéristiques cliniques

Cette étude compte 73 patients atteints d'une maladie de Crohn colique ou iléocolique, dont 57 avec une maladie active (SES-CD  $\geq 3$ ) au moment de l'inclusion. Le **tableau I** illustre les caractéristiques cliniques des participants ainsi que leur traitement. La cohorte de patients avec maladie active est stratifiée selon la Classification de Montreal<sup>17</sup> entre maladie non sténosante non fistulisante (B1, n = 40) et maladie sténosante ou fistulisante (B2 ou B3, n = 17)<sup>17</sup>. D'autre part, cette cohorte est également divisée selon le phénotype endoscopique au moment de la coloscopie : phénotype endoscopique typique de Crohn (n= 42) ou "UC-like" (n=15)<sup>18, 28, 29</sup>. **Figure 4**



**Figure 4. Représentation des sous-groupes de patients.**

Sous-groupes avec maladie endoscopique active (SES-CD  $\geq 3$ ) (*gauche*) et inactive (SES-CD 0-2) (*droite*). *B1 disease* : maladie au comportement inflammatoire. *Typical CD* : maladie avec phénotype endoscopique typique. *UC-Like* : maladie avec phénotype endoscopique rappelant la colite ulcéreuse. *Typical CD-B1* : maladie avec phénotype endoscopique typique et comportement inflammatoire. *B2 or B3 disease* : maladie au comportement sténosant ou fistulisant. *Complete mucosal healing* : guérison complète de la muqueuse.

**Tableau I. Caractéristiques cliniques de la cohorte au moment du recrutement.**

	MALADIE ACTIVE	MALADIE INACTIVE	
	n = 57	SES-CD = 0 n = 12	SES-CD 1-2 n = 4
Sexe féminin n, (%)	29 (50.9)	7 (58.3)	2 (50.0)
Age <i>médiane</i> , (IQR)	38 (25.3 – 49.8)	50 (46.8 – 52.8)	50 (37.0 – 66.0)
Tabagisme actif n, (%)	13 (22.8)	0	0
Durée de la maladie (années) <i>médiane</i> , (IQR)	5 (0 – 12.8)	18 (14.3 – 24.4)	23 (15.5 – 24.5)
Antécédent de résection chirurgicale n, (%)	6 (10.5)	2 (16.7)	1 (25.0)
<b>CLASSIFICATION DE MONTREAL</b>			
A1 n, (%)	8 (14.0)	-	-
A2 n, (%)	42 (73.7)	11 (91.7)	3 (75.0)
A3 n, (%)	7 (12.3)	1 (8.3)	1 (25.0)
L2 n, (%)	29 (50.9)	9 (75.0)	4 (100.0)
L3 n, (%)	28 (49.1)	3 (25.0)	-
B1 n, (%)	40 (70.2)	9 (75.0)	3 (75.0)
B2 n, (%)	9 (15.8)	1 (8.3)	-
B3 n, (%)	8 (14.0)	2 (16.7)	1 (25.0)
Maladie périanaire n, (%)	10 (17.5)	2 (16.7)	1 (25.0)
Aspect endoscopique UC-like n, (%)	15 (26.2)	-	-
Nouveau diagnostic n, (%)	15 (26.2)	-	-
Aucun traitement dans le dernier mois n, (%)	14 (24.6)	2 (16.6)	-
Traitement non anti-TNF n, (%) <sup>a</sup>	14 (24.6) <sup>b</sup>	5 (41.7)	3 (75.0)
Traitement anti-TNF n, (%) <sup>c</sup>	14 (24.6) <sup>d</sup>	5 (41.7)	1 (25.0)

<sup>a</sup> 5-Aminosalicylates (5-ASA) (n = 9), thiopurines (n = 5), methotrexate (n = 4) hydrocortisone intrarectale (Cortifoam) (n = 1), prednisone (n = 1), combinaison 5-ASA and prednisone (n = 1), combinaison thiopurine and prednisone (n = 1)

<sup>b</sup> Aucun dosage de 6TG n'était disponible pour les 4 patients avec maladie active malgré prise de thiopurines

<sup>c</sup> Infliximab et adalimumab en thérapie seule (n = 13) ou en combothérapie avec une thiopurine ou du methotrexate (n = 7)

<sup>d</sup> Parmi les individus avec maladie active malgré prise d'anti-TNF, aucun anticorps anti-infliximab ou anti-adalimumab n'a été décelé, 3 patients avaient des niveaux sanguins thérapeutiques et 2 patients présentaient des niveaux sanguins sous-thérapeutiques.

En effet, au moment de l'inclusion, 15 individus présentaient des caractéristiques endoscopiques s'apparentant à la colite ulcéreuse, notamment une atteinte continue de la muqueuse colique avec perte du relief vasculaire, érosions et saignements spontanés. Toutefois, plusieurs caractéristiques cliniques nous ont incitées à maintenir un diagnostic de maladie de Crohn chez ces patients: atteinte segmentaire avec épargne du rectum sans traitement récent (n = 8), inflammation iléale à l'endoscopie avec confirmation histologique (iléite chronique active) ou corrélée à l'IRM (n = 5), examen endoscopique antérieur avec allure typique de Crohn (n = 2), maladie caecale isolée (n = 1), maladie périanale concomitante (n = 2), atteinte gastrointestinale haute (n = 1) et présence de granulomes immuns non nécrosants non associés à des cryptes rupturées (n = 3). La répartition des traitements parmi les individus avec phénotype UC-like était similaire à celle des individus avec phénotype CD typique (**Tableau II**). Les individus avec phénotype endoscopique « UC-Like » avaient tous une maladie avec comportement non sténosant non fistulisant (B1)<sup>17</sup>.



**Tableau II. Répartition des sous-groupes de traitement selon le phénotype endoscopique, le comportement et la localisation de la maladie.**

	Phénotype endoscopique		Comportement		Localisation	
	UC-like (n = 15)	Typical CD (n = 42)	B1 (n = 40)	B2 ou B3 (n = 17)	L2 (n = 29)	L3 (n = 28)
Aucun traitement dans le dernier mois n, (%)	3 (20.0)	11 (26.2)	9 (22.5)	5 (29.4)	4 (13.8)	10 (35.7)
Traitement non biologique n, (%) <sup>a</sup>	4 (27.7)	10 (23.8)	11 (27.5)	3 (17.6)	7 (24.1)	7 (25.0)
Traitement biologique n, (%) <sup>b</sup>	3 (20.0)	11 (26.2)	7 (17.5)	7 (41.2)	8 (27.6)	6 (21.4)
Nouveau diagnostic n, (%)	5 (33.3)	10 (23.8)	13 (32.5)	2 (11.8)	10 (34.5)	5 (17.9)

<sup>a</sup> 5-Aminosalicylates (5-ASA) (n = 6), thiopurines (n = 2), methotrexate (n = 2), hydrocortisone intrarectale (Cortifoam) (n = 1), prednisone (n=1) combinaison 5-ASA and prednisone (n =1), combinaison thiopurine and prednisone (n =1)

<sup>b</sup> Infliximab et adalimumab en thérapie seule (n = 9) ou en combothérapie avec une thiopurine ou du methotrexate (n = 5)

Les 16 participants considérés en rémission endoscopique (SES-CD < 3) incluaient 4 individus avec SES-CD 1 ou 2, témoignant d'une certaine inflammation résiduelle, mais sans ulcération (**Figure 4**). Étant donné que ce travail vise à évaluer le profil immun associé à des signes endoscopiques d'inflammation vs une muqueuse strictement non inflammée, les sous-groupes avec maladie active (SES-CD ≥3) ont été comparés aux sous-groupes avec guérison muqueuse complète (SES-CD = 0, n=12) ou aux contrôles sains (n=16).

## 2. Évaluation de la sévérité clinique et endoscopique

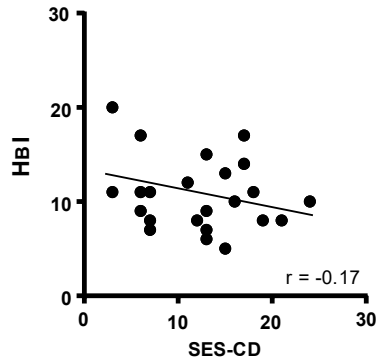
Le HBI et le SES-CD ont été calculés pour chaque participants. Le **tableau III** illustre la répartition de ces scores dans la cohorte. Malgré que seulement 21.9% de la cohorte était en rémission à la fois clinique et endoscopique, 63.0% des patients étaient en rémission clinique selon le HBI. En présence de maladie cliniquement et endoscopiquement active, il n'y avait pas de corrélation entre le HBI et le SES-CD (**Figure 5**).

**Tableau III. Indices de sévérité clinique et endoscopique.**

	Harvey Bradshaw Index (HBI) <sup>a</sup> n, (%)	Simple Endoscopic Score (SES-CD) <sup>b</sup> n, (%)
Remission	46 (63.0)	16 (21.9)
Maladie légère	5 (6.8)	18 (24.7)
Maladie modérée	15 (20.5)	26 (35.6)
Maladie sévère	3 (4.1)	13 (17.8)
Données manquantes	4 (5.1)	-

<sup>a</sup> Indice Harvey Bradshaw : rémission < 5, maladie légère 5-7, maladie modérée 8-16, maladie sévère > 16

<sup>b</sup> Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease: rémission 0-2, maladie légère 3-6, maladie modérée 7-15, maladie sévère ≥16

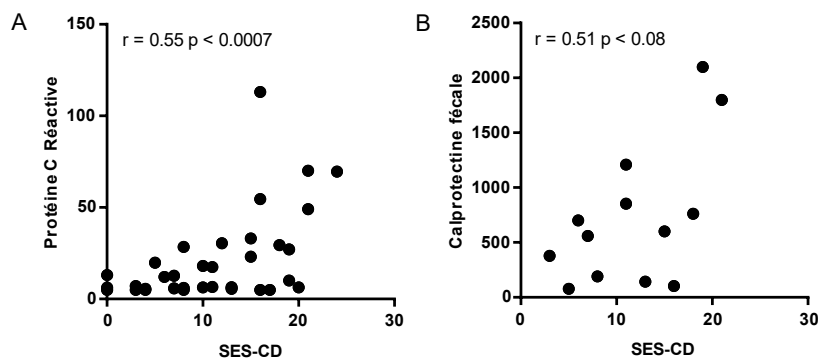


**Figure 5. Corrélation entre la sévérité clinique et endoscopique en présence de maladie active.**

Coefficient de corrélation de Spearman,  $n=23$

### 3. Protéine C réactive et calprotectine fécale

Le dosage de la protéine C réactive et de la calprotectine fécale étaient disponibles chez 41 et 14 patients respectivement. Parmi les individus avec protéine C réactive, 36 avaient un SES-CD  $\geq 3$ . La valeur de protéine C réactive était positivement corrélée avec la sévérité endoscopique, mais 17 patients avaient une valeur de protéine C réactive inférieure à 10 malgré une inflammation colique notable (**Figure 6A**). Parmi les individus avec dosage de calprotectine fécale, 13 avaient une inflammation colique. Une tendance vers une corrélation entre la valeur de calprotectine fécale et le SES-CD fut observée (**Figure 6B**).



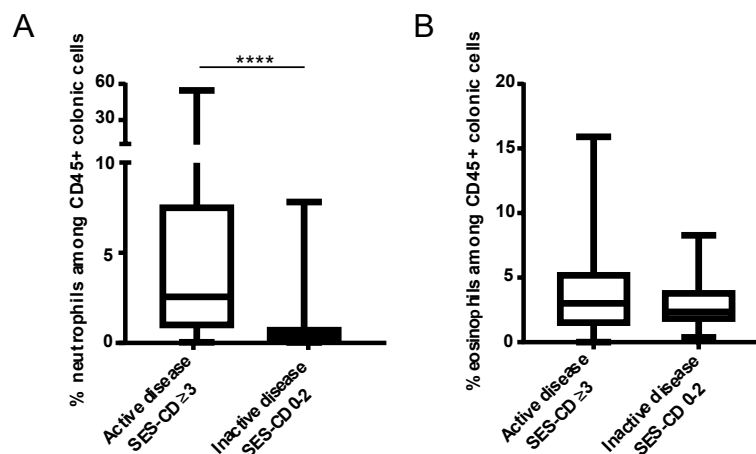
**Figure 6. Corrélations entre les marqueurs inflammatoires et le SES-CD parmi les individus avec maladie active.**

A) Protéine C réactive, coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 36$ . B) calprotectine fécale, coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 13$ .

Évaluation quantitative des populations granulocytaires dans la muqueuse et dans le sang en fonction de l'activité de la maladie

### 1. Les neutrophiles infiltrent la muqueuse colique inflammatoire, peu importe le phénotype de la maladie

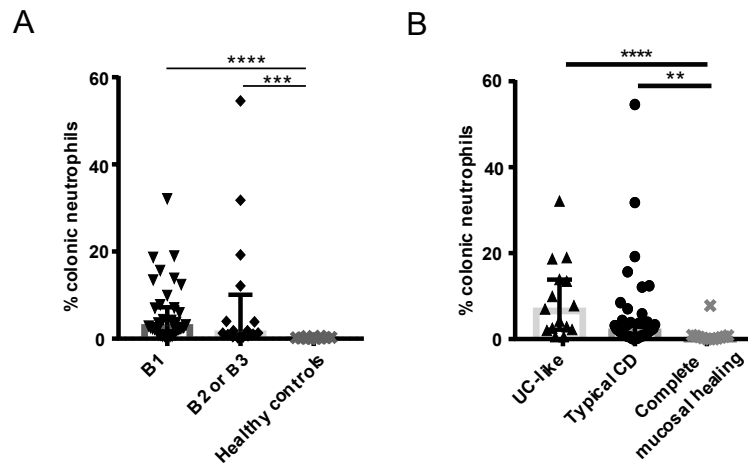
Premièrement, nous avons évalué la fréquence des neutrophiles et des éosinophiles au sein de la muqueuse colique selon la présence de maladie active (SES-CD  $\geq 3$ ) ou inactive (SES-CD 0-2). La fréquence des neutrophiles au sein de la muqueuse inflammée était significativement augmentée comparativement aux individus en rémission endoscopique (**Figure 7A**), alors qu'il n'y avait pas de différence pour les éosinophiles entre les deux groupes (**Figure 7B**).



**Figure 7. Fréquences des neutrophiles et des éosinophiles dans la muqueuse colique selon l'activité de la maladie.**

A) Fréquence des neutrophiles coliques selon l'activité de la maladie B) Fréquence des éosinophiles coliques selon l'activité de la maladie. Active disease, n = 57. Inactive disease, n = 16. Test U de Mann-Whitney \*\*\*\* p < 0.0001.

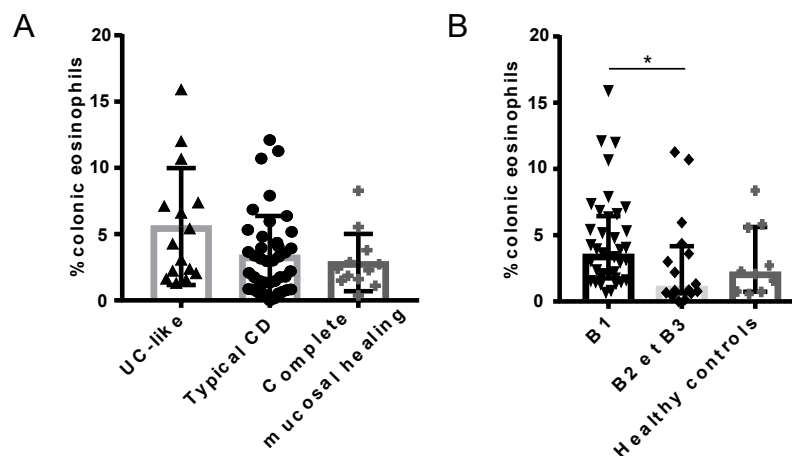
L'infiltration neutrophilique était significative au sein de la muqueuse peu importe le comportement de la maladie et indépendamment du phénotype endoscopique (**Figure 8**). Tel qu'illustré, les individus contrôles sains ainsi que ceux en guérison muqueuse complète présentaient des fréquences similaires de neutrophiles coliques, permettant l'utilisation de ces deux groupes de façon interchangeable comme groupes contrôles.



**Figure 8. Fréquences des neutrophiles au sein de la muqueuse colique selon le comportement et le phénotype endoscopique de la maladie.**

A) Fréquence des neutrophiles coliques selon le comportement de la maladie B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls: n = 10. B) Fréquence des neutrophiles coliques selon le phénotype endoscopique UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001 \*\*\*\* p < 0.0001

Deuxièmement, bien que des fréquences similaires d'éosinophiles au sein de la muqueuse furent observées dans les sous-groupes avec maladie active comparativement aux individus en rémission ou les contrôles sains (**Figure 7B et 9**), le sous-groupe avec maladie B2 ou B3 présentait significativement moins d'éosinophiles au sein de la muqueuse inflammée que les individus avec une maladie B1 (**Figure 9B**).



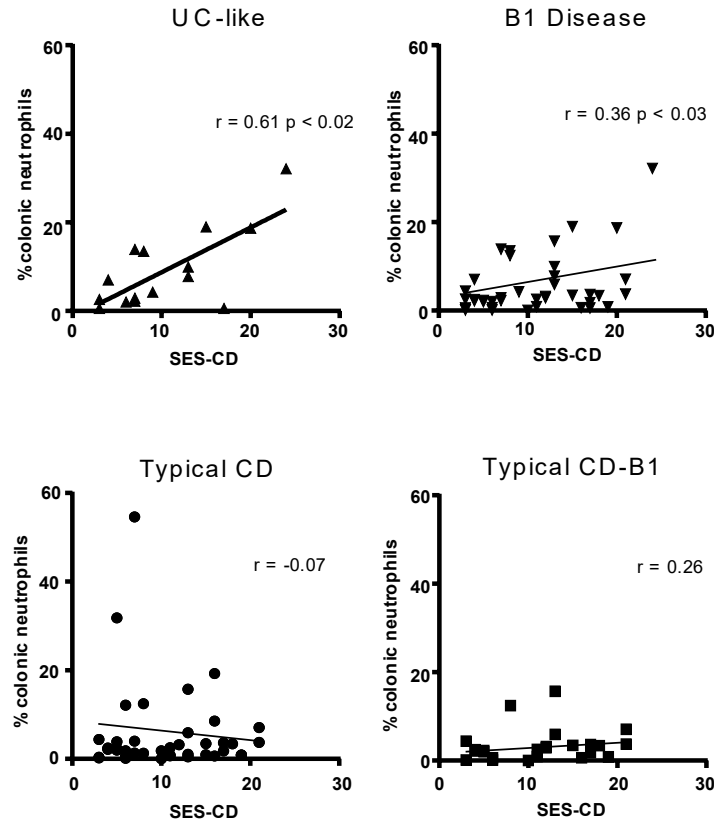
**Figure 9. Fréquences des eosinophiles au sein de la muqueuse colique selon le phénotype endoscopique et le comportement de la maladie.**

A) Fréquence des eosinophiles coliques selon le phénotype endoscopique UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. B) Fréquence des eosinophiles coliques selon le comportement de la maladie B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls: n = 10. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. \* p < 0.05

On retient donc que peu importe l'aspect de la maladie, les neutrophiles infiltrent significativement la muqueuse colique inflammée, alors que la fréquence des eosinophiles demeure inchangée, indépendamment de la présence de maladie de Crohn active lors de l'évaluation endoscopique.

## **2. La fréquence des neutrophiles coliques corrèle avec le SES-CD uniquement parmi les individus avec un phénotype endoscopique UC-like**

Nous mettrons l'accent sur les corrélations entre la sévérité endoscopique et les fréquences des différentes populations granulocytaires parmi les cellules exprimant le CD45, étant donné que l'indice de sévérité clinique (HBI) n'était corrélé ni avec le score de sévérité endoscopique (SES-CD) (**Figure 5**), ni avec la fréquence des cellules hématopoïétiques (CD45<sup>+</sup>) au sein de la muqueuse (**Figure 3**). Tel qu'illustré, les corrélations positives entre les fréquences de neutrophiles au sein de la muqueuse colique et la sévérité endoscopique étaient uniquement observées parmi les individus avec phénotype endoscopique UC-like et maladie B1 (**Figure 10**). La faible corrélation parmi les individus avec maladie B1 était probablement influencée par la forte corrélation observée parmi le sous-groupe « UC-like », étant donné l'absence de corrélation parmi les individus avec un phénotype endoscopique CD typique.



**Figure 10. Corrélation entre la fréquence des neutrophiles coliques et le SES-CD selon le phénotype et comportement de la maladie.**

UC-like : coefficient de corrélation de Spearman,  $n=15$ . B1 disease : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 40$ . Typical CD : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 42$ . Typical CD-B1 : coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$ .

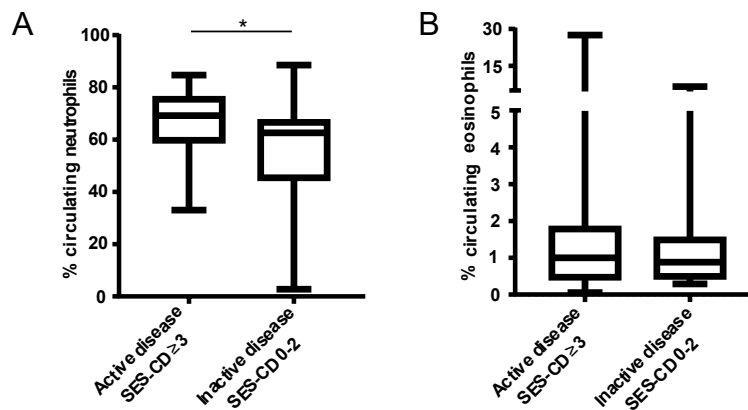
Aucune corrélation significative ne fut observée entre les fréquences de eosinophiles coliques et la sévérité endoscopique (présentées au **Tableau IV** à la fin de la section).

Ces données confirment l'accumulation de neutrophiles identifiés par cytométrie de flux au sein de la muqueuse colique inflammée en maladie de Crohn, quel que soit le phénotype ou comportement de la maladie. Cependant, seul un aspect endoscopique « UC-like » implique une infiltration neutrophilique proportionnelle à la sévérité endoscopique.



### 3. Une faible augmentation des neutrophiles circulants est associée à l'activité endoscopique de la maladie de Crohn

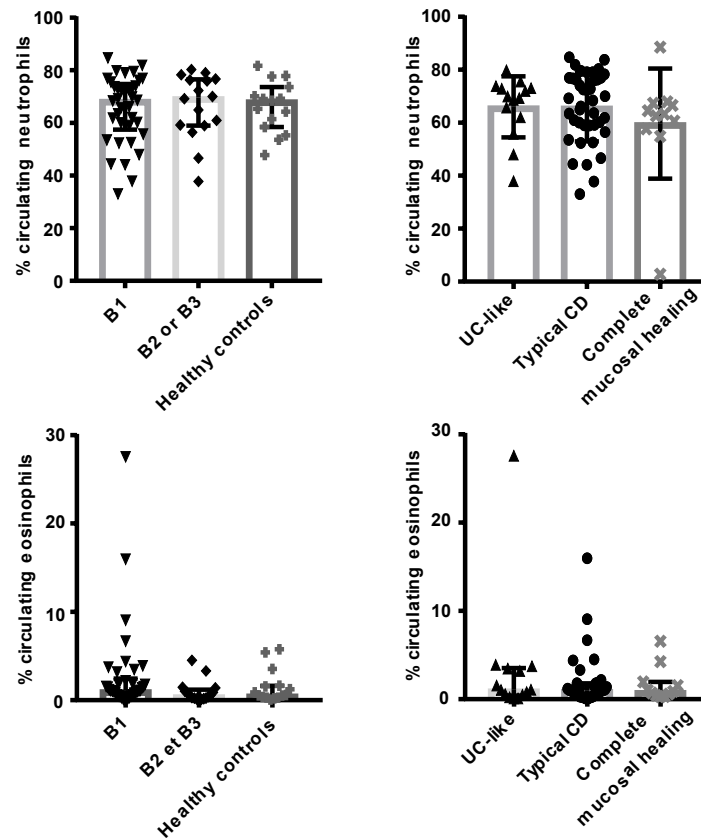
Nous avons ensuite comparé les fréquences des neutrophiles et eosinophiles circulants selon l'activité de la maladie, à la recherche de résultats similaires à ceux observés avec les cellules de la muqueuse. Tel que présenté à la **Figure 11**, seule la fréquence des neutrophiles circulants était légèrement accrue en présence de maladie active, alors que les fréquences des eosinophiles circulants demeuraient similaires, peu importe l'activité de la maladie.



**Figure 11. Fréquences des neutrophiles et des éosinophiles circulants selon l'activité de la maladie.**

A) Fréquence des neutrophiles circulants selon l'activité de la maladie B) Fréquence des eosinophiles circulants selon l'activité de la maladie. Active disease, n = 57. Inactive disease, n = 16. Test U de Mann-Whitney \*  $p < 0.05$ .

Cependant, aucune différence significative entre les fréquences des neutrophiles et éosinophiles circulants ne fut observée selon le comportement de la maladie ou le phénotype endoscopique (**Figure 12**).

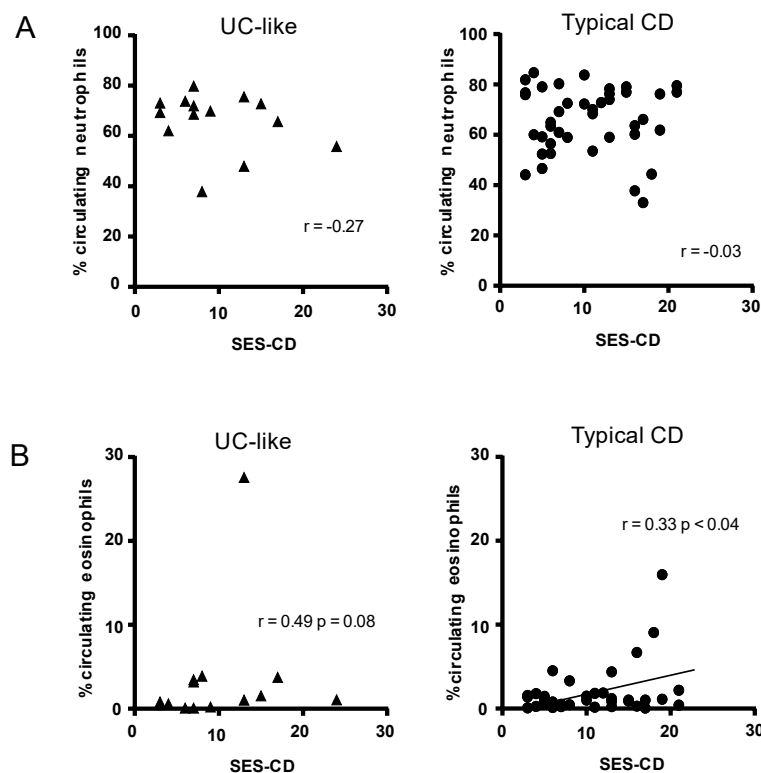


**Figure 12. Fréquences des neutrophiles et éosinophiles circulants selon le comportement et le phénotype de la maladie.**

Fréquence des neutrophiles (*haut*) et des éosinophiles circulants (*bas*) selon le comportement de la maladie B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls: n = 16 et selon le phénotype endoscopique UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis.

#### 4. La fréquence des éosinophiles circulants est faiblement corrélée au SES-CD parmi les individus avec phénotype endoscopique typique.

Ayant observé une corrélation significative entre la fréquence des neutrophiles coliques et la sévérité de la maladie parmi le sous-groupe avec phénotype endoscopique « UC-like », nous avons voulu évaluer la présence d'une corrélation similaire avec les neutrophiles circulants. Aucune corrélation ne fut observée entre la fréquence des neutrophiles circulants et la sévérité endoscopique (**Figure 13A**). Par contre, la fréquence des éosinophiles circulants était corrélée au SES-CD parmi les individus avec phénotype endoscopique typique et une tendance vers une corrélation significative était observée au sein du sous-groupe UC-like (**Figure 13B**).



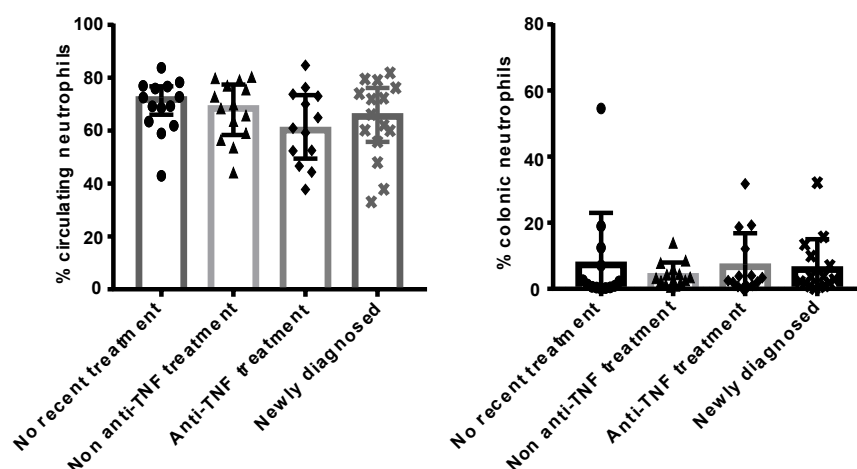
**Figure 13. Corrélations entre la fréquence des neutrophiles et des éosinophiles circulants et le SES-CD selon le phénotype endoscopique.**

Corrélation entre la fréquence A) des neutrophiles et B) des éosinophiles circulants et le SES-CD selon le phénotype endoscopique UC-like : coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 15$ . Typical CD : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 42$ .

## **5. Effets du traitement sur les fréquences des neutrophiles et des eosinophiles**

À la lumière des résultats observés, nous avons voulu déterminer si le traitement de la maladie de Crohn avait eu un impact sur les fréquences des neutrophiles et eosinophiles. En effet, les corticostéroïdes occasionnent une démarginalisation des neutrophiles dans le compartiment circulant suite à une inhibition de la production de L-sélectine, selon certaines études animales<sup>178</sup>. Ils sont également associés à une diminution de la fréquence des eosinophiles circulants, inhibent leur recrutement tissulaire et accélèrent leur apoptose<sup>179</sup>. Les anti-TNF peuvent aussi occasionner une diminution de la fréquence des neutrophiles circulants<sup>180, 181</sup>, possiblement via une diminution de la production de GM-CSF par les lymphocytes T intestinaux<sup>181</sup>. Le TNF $\alpha$  ayant une forte activité chimiotactique<sup>182</sup>, contribuant au recrutement des eosinophiles via l'activation de l'endothélium<sup>179</sup> ainsi qu'à leur survie<sup>183</sup>, il est possible que les agents anti-TNF aient également un impact sur les fréquences et corrélations impliquant ces cellules.

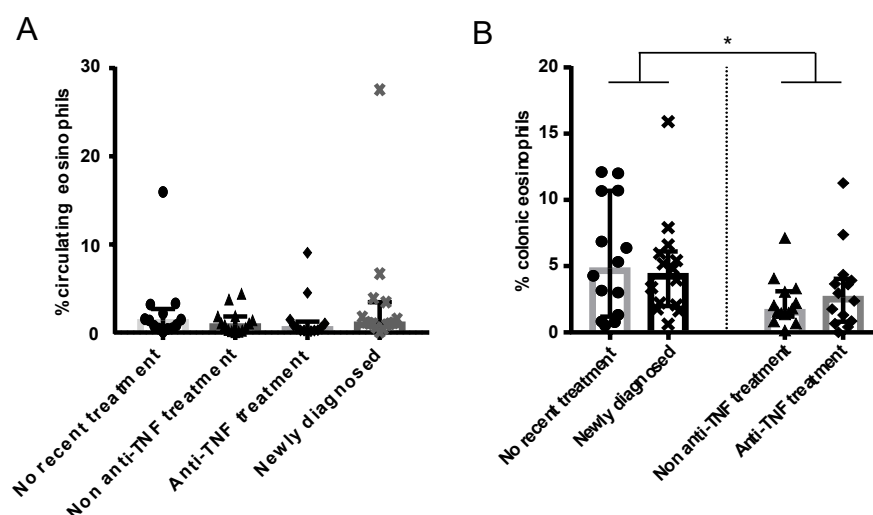
Tel qu'illustré au **tableau II**, les individus étaient relativement bien répartis en fonction de leur sous-groupe de traitement, à l'exception de ceux avec maladie sténosante ou fistulisante (B2 ou B3), qui comptait davantage d'individus sous anti-TNF comparativement aux individus avec maladie B1. En examinant l'ensemble de la cohorte, aucune différence ne fut notée entre les fréquences des neutrophiles circulants et muqueux en fonction du traitement, (**Figure 14**), et ce, même en ne comparant que les individus sous anti-TNF (n = 14) avec le reste de la cohorte, ou en regroupant les individus en cours de traitement et ceux sans traitement récent (incluant les nouveaux diagnostics).



**Figure 14. Fréquences des neutrophiles circulants et au sein de la muqueuse inflammée en fonction du traitement.**

Pas de traitement récent : n = 14, Traitement non anti-TNF : n = 14 Traitement anti-TNF : n = 14, Nouveaux diagnostics : n = 15. Test de Kruskal-Wallis.

Par contre, bien qu'aucune différence ne fut notée entre les fréquences des éosinophiles circulants et muqueux en fonction des groupes de traitement initialement utilisés pour le recrutement (**Figure 15A**), en comparant les individus en cours de traitement au moment de l'inclusion et ceux sans traitement (aucun traitement récent et nouveaux diagnostic), on observait une diminution significative de la fréquence des eosinophiles coliques au sein du groupe réfractaire à un traitement (**Figure 15B**).



**Figure 15. Fréquences des éosinophiles circulants et coliques en fonction du traitement**

A) Comparaison de la fréquence des eosinophiles circulants en fonction du traitement. Test Kruskal-Wallis. B) Comparaison de la fréquence des eosinophiles coliques en fonction du traitement. Histogramme représentant à la fois les quatre sous-groupes individuellement (Test de Kruskal Wallis,  $p = \text{NS}$ ) et la comparaison entre les individus sans traitement et avec maladie réfractaire au traitement (Test U de Mann-Whitney). \*  $p < 0.05$ . Pas de traitement récent  $n = 14$  Agents non biologiques  $n = 14$  Agents biologiques  $n = 14$  Nouveaux diagnostics  $n = 15$

Nous avons finalement évalué si parmi les sous-groupes pré-établis pour le recrutement des participants, des corrélations significatives étaient présentes entre la fréquence des cellules et la sévérité endoscopique. Fait intéressant, la corrélation entre la fréquence des eosinophiles circulants et le SES-CD semblaient être préférentiellement observée parmi les individus avec maladie connue et sans traitement récent (**Tableau IV**).

**Tableau IV. Corrélations entre les fréquences des neutrophiles et des eosinophiles et le SES-CD selon les sous-groupes.**

	% neutrophiles circulants	% neutrophiles muqueuse	% eosinophiles circulants	% eosinophiles muqueuse
Cohorte entière (n = 57) †	r = -0.09	r = 0.13	r = 0.23	r = 0.12
Phénotype UC-like (n = 15) ‡	r = -0.27	<b>r = 0.61 p &lt; 0.02</b>	r = 0.49 p < 0.08	r = 0.22
Phénotype endoscopique CD typique (n = 42) †	r = -0.04	r = -0.07	<b>r = 0.33 p &lt; 0.04</b>	r = 0.17
Maladie B1 (n = 40) †	r = -0.09	<b>r = 0.36 p &lt; 0.03</b>	r = 0.25	r = 0.03
Typical CD-B1 (n = 25) ‡	r = -0.01	r = 0.26	r = 0.24	r = 0.14
Nouveaux diagnostics (n = 15) ‡	r = -0.04	r = 0.13	r = -0.35	r = -0.26
Aucun traitement dans le dernier mois (n = 14) ‡	r = 0.06	r = 0.29	<b>r = 0.58 p &lt; 0.04</b>	r = 0.41
Traitement non biologique (n = 14) ‡	r = -0.03	r = 0.08	r = 0.29	r = 0.14
Traitement biologique (n = 14) ‡	r = -0.32	r = 0.26	r = -0.18	r = 0.18

† Coefficient de corrélation de Pearson

‡ Coefficient de corrélation de Spearman

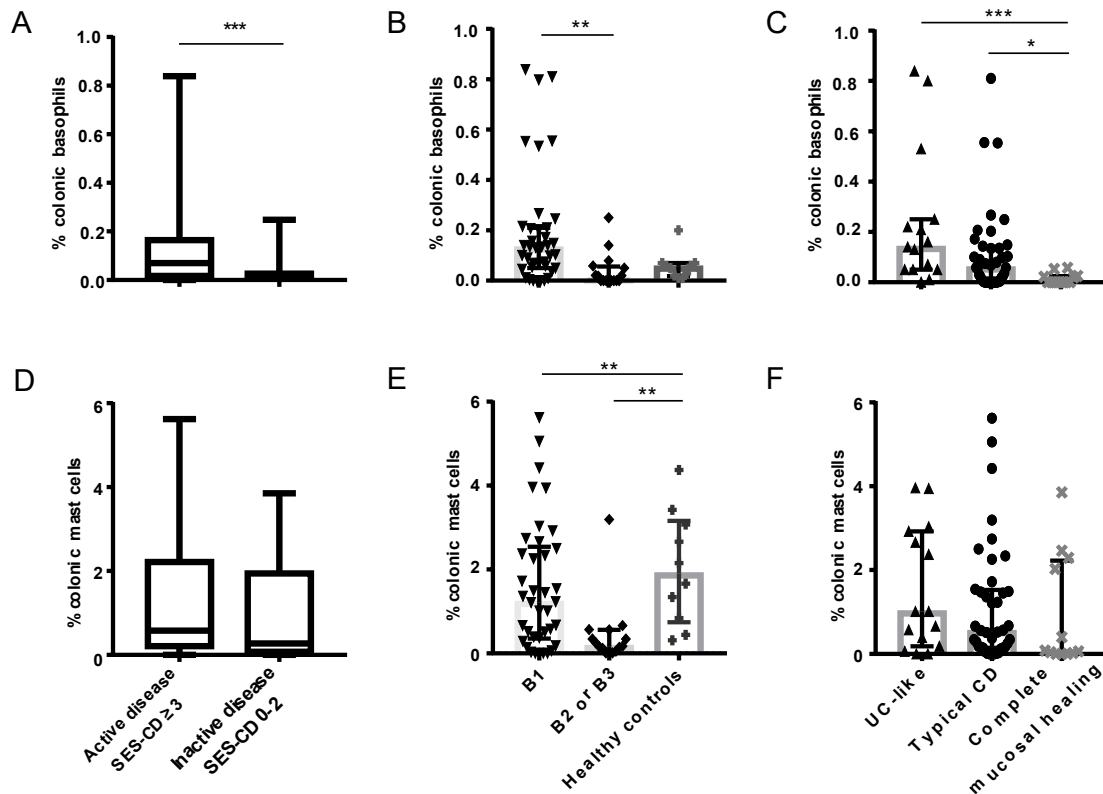
En résumé, la maladie active est associée à une infiltration neutrophilique du colon et ce, indépendamment du phénotype endoscopique ou du traitement. La fréquence des neutrophiles coliques est corrélée avec la sévérité endoscopique de la maladie au sein d'un sous-groupe de patients avec maladie non sténosante non pénétrante et particulièrement chez les patients présentant un aspect endoscopique s'apparentant à la colite ulcéreuse. Par contre, sans être augmentée, la fréquence des eosinophiles dans le sang était corrélée à la sévérité endoscopique chez les individus avec phénotype endoscopique typique et sans traitement récent. Il y avait moins d'éosinophiles colique en présence d'une maladie sténosante ou fistulisante.

## 6. La muqueuse inflammatoire est infiltrée par des basophiles.

Nous avons finalement examiné les fréquences des basophiles et des mastocytes, qui semblent également jouer un rôle dans l'inflammation de la muqueuse intestinale <sup>145, 146, 149, 150, 159</sup>.

Nous avons d'abord observé que les basophiles, contrairement aux mastocytes, infiltraient significativement la muqueuse inflammée en maladie de Crohn comparativement aux individus en rémission endoscopique (**Figure 16A**). Plus précisément, la fréquence des basophiles coliques était plus élevée en présence de maladie B1 comparativement aux individus avec maladie B2 ou B3, ainsi qu'en présence de n'importe quel phénotype endoscopique comparativement aux individus en rémission (**Figure 16B et C**). Par contre, la fréquence des mastocytes était similaire en présence de maladie active et inactive, bien que les individus avec maladie sténosante ou fistulissante démontraient significativement moins de mastocytes comparativement aux individus avec maladie B1 et les contrôles sains (**Figure 16 D et E**).

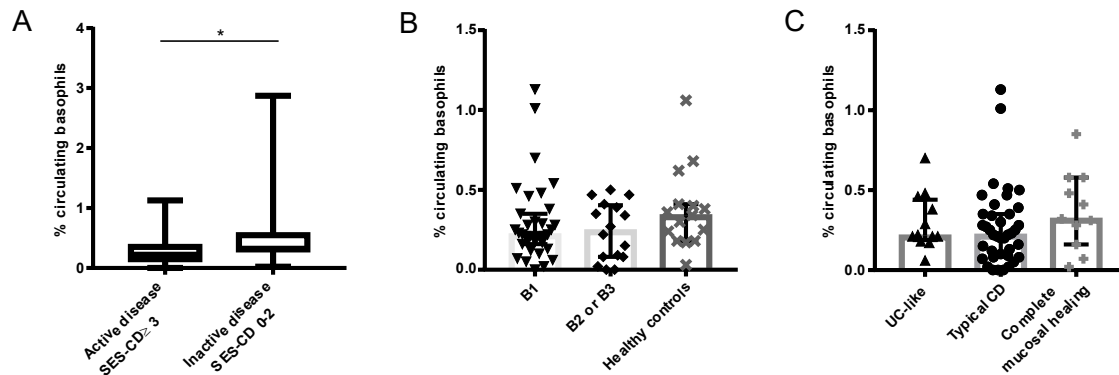




**Figure 16. Fréquences des basophiles et mastocytes coliques selon l'activité, le comportement et le phénotype de la maladie.**

Fréquence des basophiles et des mastocytes coliques selon A) et D) l'activité de la maladie (Active disease : n = 57, Inactive disease : n = 16, Test de U Mann-Whitney), B) et E) le comportement de la maladie (B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls: n = 10, Test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn) et C) et F) le phénotype endoscopique (UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn). \* p < 0.05 \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001.

Enfin, la fréquence des basophiles circulants était légèrement inférieure en présence de maladie active comparativement aux individus en rémission endoscopique (**Figure 17A**). Aucune différence ne fut observée entre les sous-groupes (**Figure 17B et C**).



**Figure 17. Fréquences des basophiles circulants selon l'activité, le comportement et le phénotype de la maladie.**

A) Fréquence des basophiles circulants selon l'activité de la maladie (Active disease : n = 57, Inactive disease : n = 16, Test de U Mann-Whitney), B) le comportement de la maladie (B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls: n = 16, Test de Kruskal-Wallis) et C) le phénotype endoscopique (UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis) \* p < 0.05

Aucune corrélation ne fut observée entre les fréquences des basophiles et mastocytes et le SES-CD dans les sous-groupes étudiés (**Tableau V**).

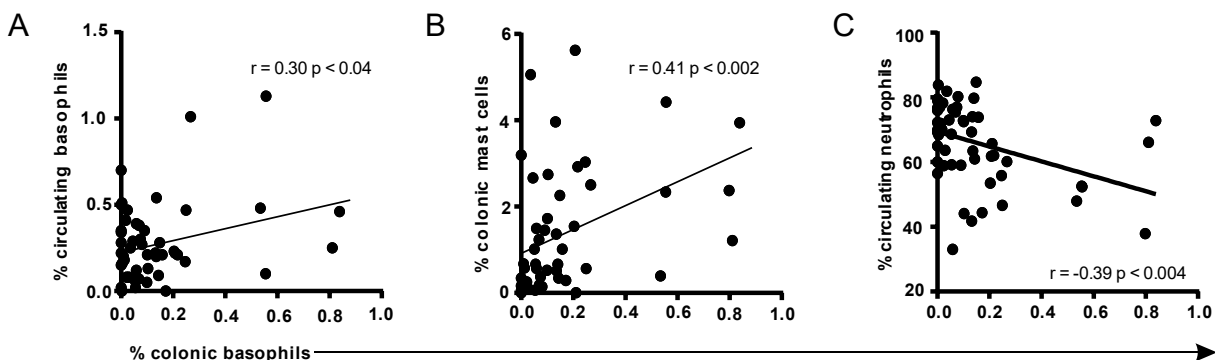
**Tableau V. Corrélations entre les fréquences des basophiles et mastocytes et le SES-CD selon les sous-groupes**

	% basophiles circulants	% basophiles muqueuse	% mastocytes
Ensemble de la cohorte active n = 57 †	r = -0.07	r = 0.11	r = -0.09
Aspect endoscopique typique CD n = 42 †	r = -0.13	r = 0.06	r = -0.10
Individus avec maladie B1 n = 40†	r = -0.06	r = 0.06	r = -0.16
Maladie B1 et aspect endoscopique typique CD n = 25‡	r = -0.18	r = 0.01	r = -0.26
UC-like n = 15‡	r = 0.17	r = 0.27	r = -0.24
Nouveaux diagnostics n = 15‡	r = -0.17	r = 0.18	r = -0.08
Aucun traitement dans le dernier mois n = 14‡	r = -0.08	r = 0.34	r = 0.24
Traitement non anti-TNF n = 14‡	r = 0.21	r = 0.25	r = -0.15
Traitement anti-TNF n = 14‡	r = -0.22	r = -0.15	r = -0.52

†coefficient de corrélation de Pearson

‡coefficient de corrélation de Spearman

Finalement, s'intéressant aux corrélations entre les cellules, la fréquence des basophiles coliques était positivement corrélée avec celles des basophiles circulants, ainsi que des mastocytes parmi les individus avec maladie active (**Figure 18A et B**). La fréquence des neutrophiles circulants était par contre inversement corrélée à celle des basophiles coliques (**Figure 18C**).



**Figure 18. Corrélation entre la fréquence des basophiles coliques et celles des autres granulocytes en présence de maladie active.**

A) Corrélation entre la fréquence des basophiles coliques et circulants B) des mastocytes C) des neutrophiles circulants. Coefficient de corrélation de Pearson,  $n=57$

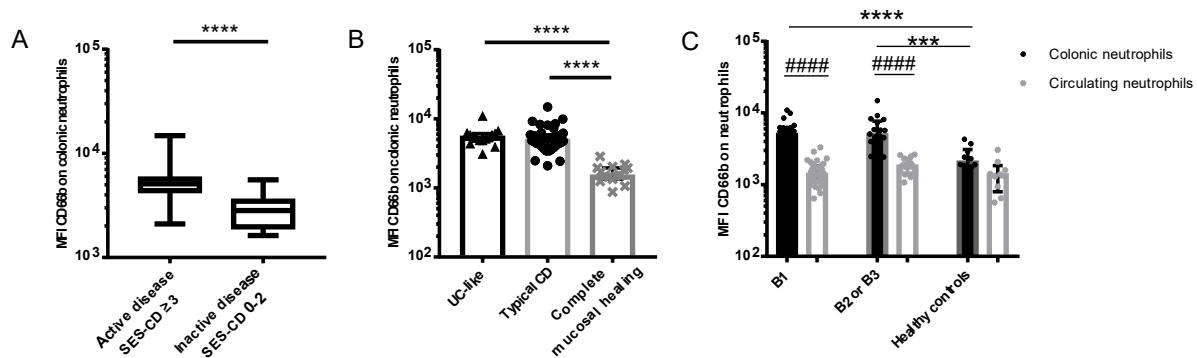
En conclusion, les basophiles infiltrent la muqueuse colique des individus avec maladie de Crohn active, plus spécifiquement les individus avec maladie B1, mais leur fréquence n'est pas corrélée avec la sévérité endoscopique. La maladie sténosante ou fistulisante est associée à une déplétion des mastocytes coliques.

## Expression du CD66b et du CD64 à la surface des neutrophiles et des eosinophiles en fonction de la sévérité de la maladie

Les fréquences des sous-populations granulocytaires n'étant pas corrélées avec la sévérité endoscopique, à l'exception des neutrophiles coliques parmi les individus avec phénotype endoscopique UC-like et des eosinophiles circulants parmi les individus avec phénotype endoscopique typique, nous nous sommes interrogés sur des corrélations potentielles avec l'expression à la surface de ces cellules de marqueurs d'activation, c'est-à-dire le CD66b et le CD64.

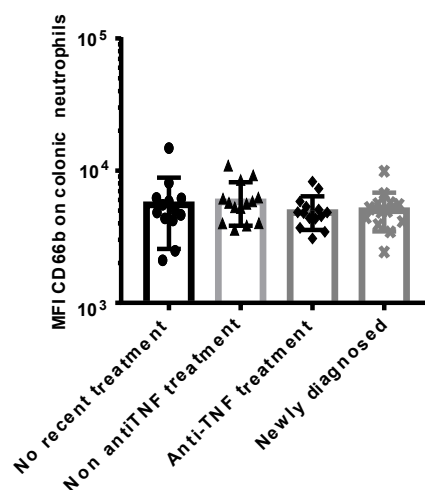
### **1. L'activation des neutrophiles coliques et circulants corrèle avec le SES-CD chez les individus avec maladie active non sténosante non fistulissante (B1).**

Une élévation significative de l'expression du CD66b fut détectée sur les neutrophiles coliques en maladie active comparativement aux individus en rémission endoscopique (**Figure 19A**). En stratifiant davantage les patients avec maladie active, l'expression du CD66b était augmentée dans tous les sous-groupes comparativement aux contrôles (**Figure 19B et C**) et ce, indépendamment du traitement (**Figure 20**).



**Figure 19. Expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique en fonction de l'activité, du phénotype et du comportement de la maladie.**

MFI du CD66b sur les neutrophiles coliques selon A) l'activité de la maladie (Active disease : n = 57, Inactive disease : n = 16, Test U de Mann-Whitney), B) le phénotype endoscopique (UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de la comparaison multiple de Dunn) et C) le comportement de la maladie. Sont représentées sur cet histogramme les MFI du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique (sphères noires) et en circulation (X gris) B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls muqueuse colique: n = 10, sang : n = 16. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de la comparaison multiple de Dunn (\*) pour les comparaisons selon le comportement et les contrôles sains. Test de Wilcoxon pour échantillons appariés (#) (contrôles sains, n = 10 pour cette analyse) \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$

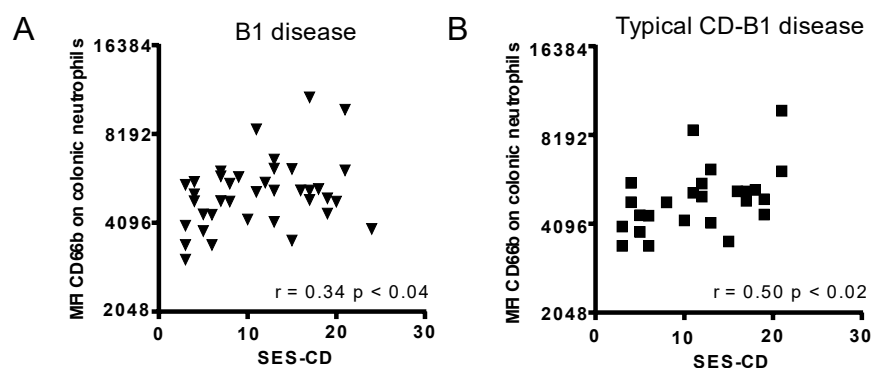


**Figure 20. Expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique en fonction du traitement**

Pas de traitement récent : n = 14, Traitement non anti-TNF : n = 14 Traitement anti-TNF : n = 14, Nouveaux diagnostics : n = 15. Test de Kruskal-Wallis.

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'expression du CD66b à la surface du neutrophile augmentait alors qu'il était dans la circulation sanguine ou bien à l'arrivée de ce dernier dans la muqueuse. Tel que présenté dans la **Figure 19C**, l'expression du CD66b augmentait significativement à la surface des neutrophiles isolés dans la muqueuse inflammée. De plus, l'expression du CD66b sur les neutrophiles circulants des patients avec maladie de Crohn active (MFI médiane = 1507, IQR 1215-1915) était comparable à celle des sujets sains (MFI médiane = 1410, IQR 946 - 2086) et à celle de la muqueuse guérie des patients CD (MFI médiane = 1503, IQR 1339 – 1945), démontrant que les neutrophiles augmentaient leur expression de CD66b uniquement lors de leur recrutement dans la muqueuse inflammatoire.

Enfin, l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques était significativement corrélée avec le SES-CD parmi les individus avec maladie B1 et ceux avec phénotypes endoscopique typique et maladie B1 **Figure 21**.

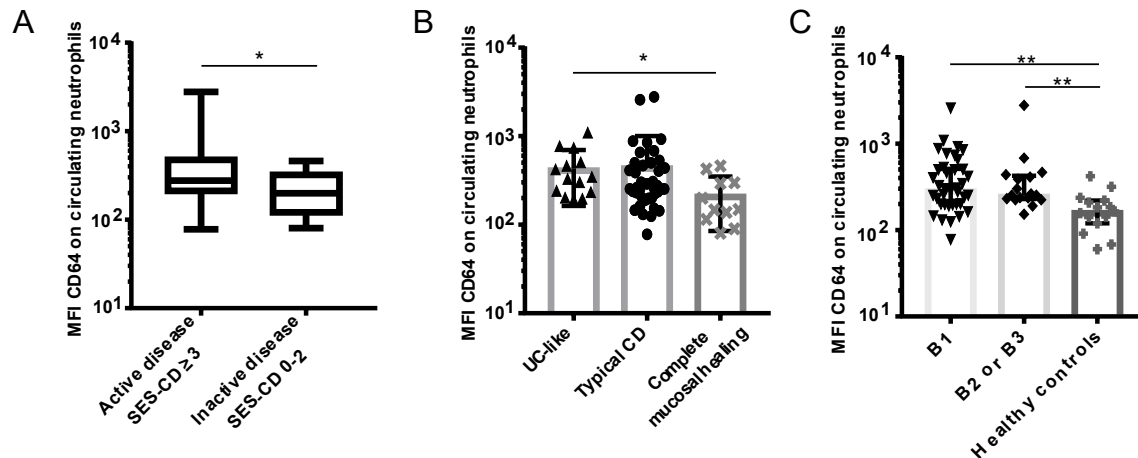


**Figure 21. Corrélation entre l'expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique et le SES-CD.**

A) Parmi les individus avec maladie B1. Coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 40$ . B) Parmi les individus avec maladie typique CD-B1. Coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$ .

Étant donné qu'il n'y avait pas de variation de l'expression du CD66b sur les neutrophiles circulants en présence de maladie active (**Figure 19C**), nous avons évalué

l'expression du CD64, un autre marqueur d'activation neutrophilique précédemment décrit comme étant corrélé à l'activité de la maladie en Crohn pédiatrique <sup>112</sup>. Effectivement, une plus forte expression du CD64 fut notée sur les neutrophiles circulants des individus avec maladie active comparativement à ceux avec maladie inactive (**Figure 22A et B**). Elle était augmentée autant parmi les individus avec maladie B1 que B2 ou B3 (**Figure 22C**).

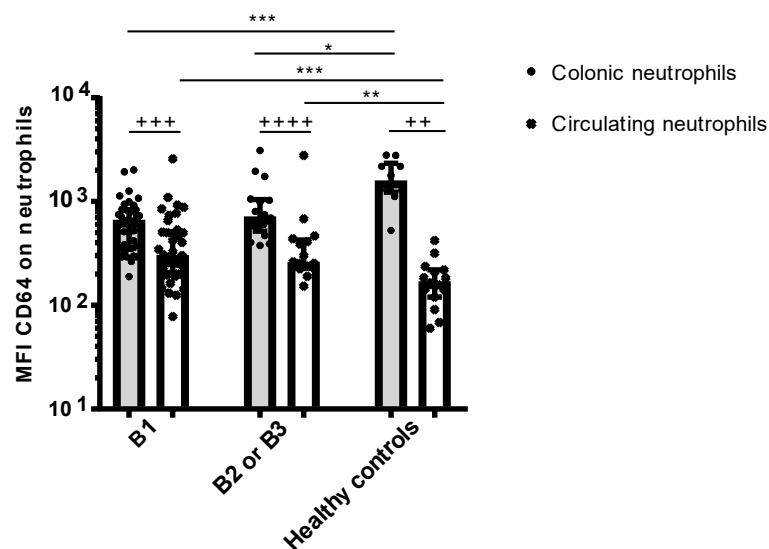


**Figure 22. Expression du CD64 sur les neutrophiles circulants en fonction de l'activité, du phénotype et du comportement de la maladie.**

MFI du CD64 sur les neutrophiles circulants selon A) l'activité de la maladie (Active disease : n = 57, Inactive disease : n = 16, Test U de Mann-Whitney), B) le phénotype endoscopique (UC-like: n = 15, Typical CD: n = 42, Complete mucosal healing: n = 12. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de la comparaison multiple de Dunn) et C) le comportement de la maladie (B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls n = 16. Test de Kruskal-Wallis suivi du test de la comparaison multiple de Dunn). \* p < 0.05 \*\* p < 0.01



L'expression du CD66b sur les neutrophiles était augmentée au moment de leur recrutement au sein de la muqueuse inflammatoire; en contrepartie, celle du CD64 l'était peu importe l'état de la muqueuse (**Figure 23**). Surprenamment, les quelques neutrophiles présents dans la muqueuse des contrôles sains exprimaient significativement plus de CD64 que ceux des individus avec maladie de Crohn active (**Figure 23**). Cette augmentation de l'expression du CD64 était également présente sur les neutrophiles coliques des individus en remission comparativement à ceux avec maladie active (MFI médiane 646.5 vs 919.5  $p < 0.05$ , test U de Mann Whitney).

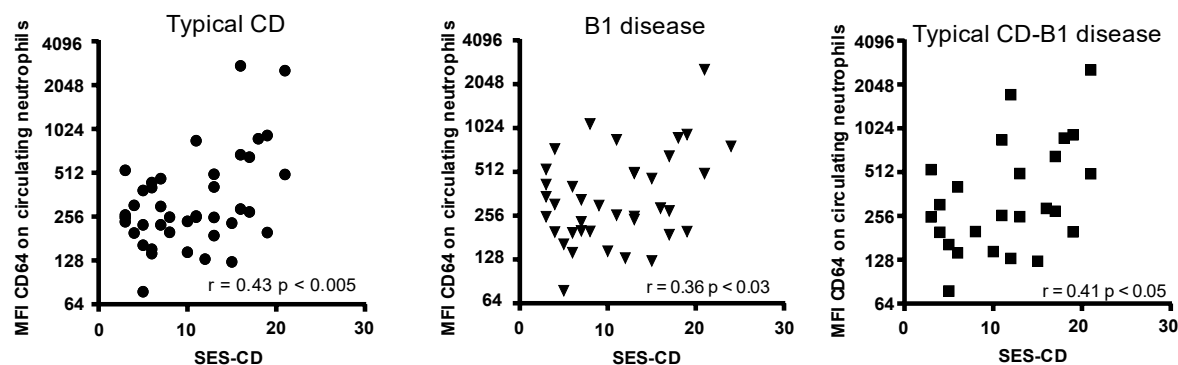


**Figure 23. Expression du CD64 sur les neutrophiles coliques et circulants selon le comportement de la maladie.**

Sont représentées sur cet histogramme les MFI du CD64 sur les neutrophiles de la muqueuse colique (sphères) et en circulation (X) B1 :  $n = 40$ , B2 or B3 :  $n = 17$ , Healthy controls muqueuse colique:  $n = 10$ , sang :  $n = 16$ . Test de Kruskal-Wallis suivi du test de la comparaison multiple de Dunn (\*) pour les comparaisons selon le comportement et les contrôles sains. Test de Wilcoxon pour échantillons appariés (+) (contrôles sains,  $n = 10$  pour cette analyse) \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Au niveau de l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants, nous avons observé une corrélation positive avec le SES-CD parmi l'ensemble de la cohorte avec activité

endoscopique, les individus avec phénotype endoscopique typique, ainsi qu'une maladie avec comportement B1 (**Figure 24**).



**Figure 24. Corrélation entre l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants et le SES-CD.**

Typical CD : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 42$ . Maladie B1 : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 40$ . Typical CD-B1 : coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$ .

Cette corrélation semblait préférentielle aux nouveaux diagnostics; une tendance vers une corrélation significative fut également observée parmi les individus avec maladie active malgré traitement biologique, ( $p < 0.09$ ) (**Tableau VI**). Aucune corrélation significative n'impliquait le CD64 sur la muqueuse.

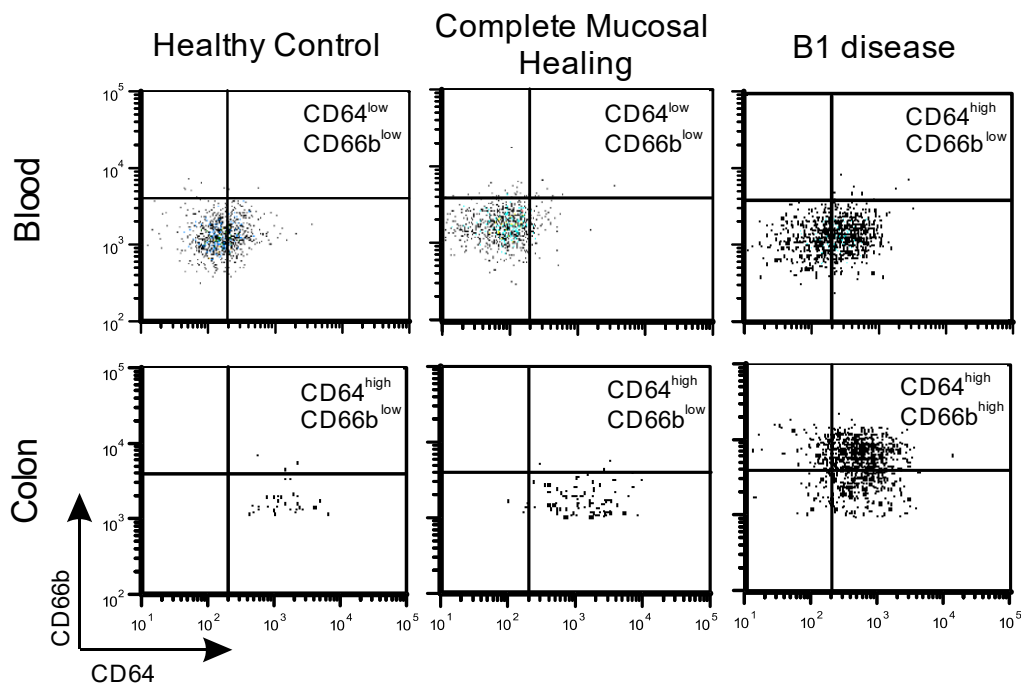
**Tableau VI. Corrélations entre l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles circulants et coliques et le SES-CD selon les sous-groupes.**

	CD66b neutrophiles circulants	CD64 neutrophiles circulants	CD66b neutrophiles muqueuse	CD64 neutrophiles muqueuse
Ensemble de la cohorte active (n = 57) †	r = 0.14	<b>r = 0.38</b> <b>p &lt; 0.005</b>	r = 0.15	r = 0.20
Phenotype endoscopique CD typique (n=42) †	r = 0.08	<b>r = 0.43</b> <b>p &lt;0.005</b>	r = 0.13	r = 0.23
Maladie B1 (n = 40) †	r = 0.27	<b>r = 0.36 p &lt;0.03</b>	<b>r = 0.34 p &lt;0.04</b>	r = 0.22
Typical CD-B1 (n = 25) ‡	r = 0.35	<b>r = 0.41 p &lt;0.05</b>	<b>r = 0.50 p &lt;0.02</b>	r = 0.36
Nouveaux diagnostics (n = 15) ‡	r = 0.20	<b>r = 0.54</b> <b>p &lt; 0.05</b>	r = 0.12	r = 0.48
Aucun traitement dans le dernier mois (n = 14) ‡	r = 0.42	r = 0.12	r = 0.35	r = -0.23
Traitement non biologique (n = 14) ‡	r = -0.08	r = 0.10	r = 0.05	r = 0.06
Traitement biologique (n = 14) ‡	r = 0.18	r = 0.50	r = 0.18	r = 0.16

†coefficient de corrélation de Pearson

‡coefficient de corrélation de Spearman

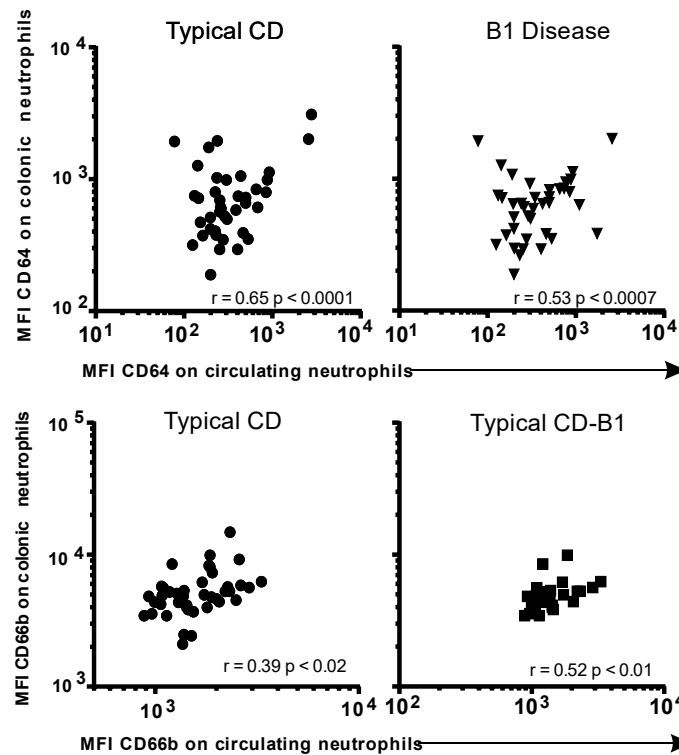
Par ailleurs, le CD64 et le CD66b étaient toujours co-exprimés sur les neutrophiles, mais leurs niveaux d'expression étaient régulés différemment entre le sang et le colon, selon le statut de la maladie: i.e. CD64<sup>low</sup>CD66b<sup>low</sup> (contrôle sain/guérison muqueuse complète) versus CD64<sup>high</sup>CD66b<sup>low</sup> (CD actif) sur les neutrophiles circulants et CD64<sup>high</sup>CD66b<sup>low</sup> (contrôle sain/guérison muqueuse complète) et CD64<sup>high</sup>CD66b<sup>high</sup> (CD actif) sur les neutrophiles coliques (Figure 25).



**Figure 25.** « Dot plot » représentatif de l'expression du CD64 et du CD66b sur les neutrophiles du sang et du colon selon l'activité de la maladie.

Graphiques représentant les neutrophiles Live-dead<sup>neg</sup> CD45<sup>+</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD9<sup>-</sup> FcεRI<sup>-</sup>

Fait intéressant, l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles coliques était toujours corrélée avec leur expression respective sur les neutrophiles circulants parmi les individus avec phénotype endoscopique CD typique (**Figure 26**).



**Figure 26. Corrélations entre l'expression du CD64 et du CD66b sur les neutrophiles du sang et de la muqueuse**

MFI CD64 (*haut*). MFI CD66b (*bas*). Typical CD : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 42$ . B1 disease : coefficient de corrélation de Pearson,  $n = 40$ . Typical CD-B1 : coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$ .

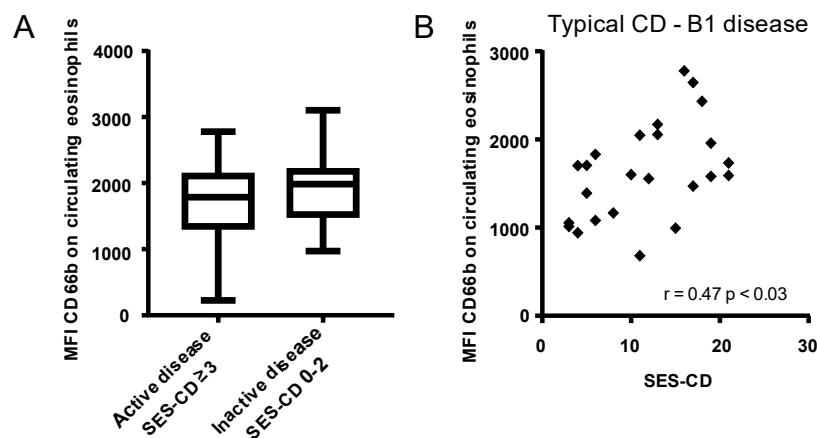
En résumé, le potentiel d'activation des neutrophiles est élevé au niveau du sang (CD64) et de la muqueuse inflammée (CD66b) chez les individus avec maladie active et corrèle avec la sévérité endoscopique parmi les individus avec maladie B1 et plus spécifiquement, avec phénotype endoscopique CD typique.

## 2. L'activation des eosinophiles circulants corrèle avec le SES-CD

Étant donné les corrélations observées entre les potentiels d'activation des neutrophiles coliques et circulants et le SES-CD, ainsi que celles précédemment décrites impliquant les fréquences des eosinophiles circulants au sein des groupes avec phénotype endoscopique typique, ainsi que les patients sans traitement récent, nous évaluerons maintenant l'expression du CD66b et du CD64 sur les eosinophiles.

D'abord, l'expression du CD66b sur les eosinophiles de la muqueuse n'était pas augmentée en présence de maladie active comparativement à la maladie quiescente et n'était pas corrélée à la sévérité endoscopique (corrélations présentées dans le **Tableau VII** à la fin de cette section).

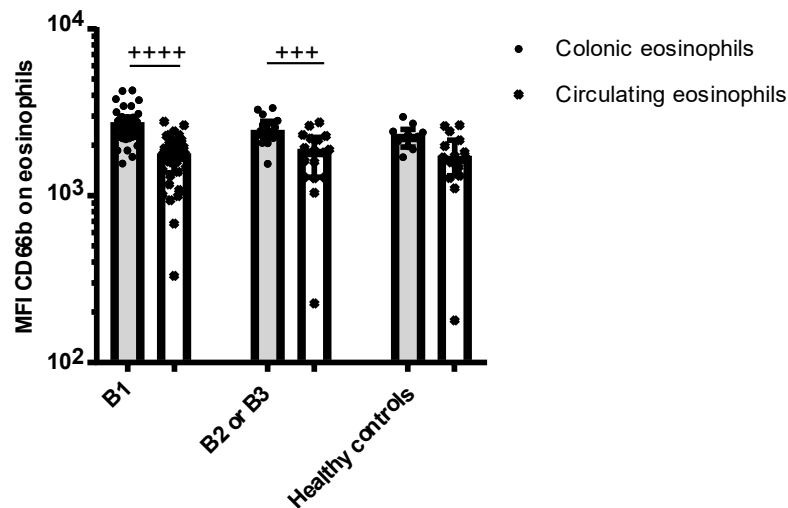
Par contre, l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants, bien qu'elle soit équivalente entre les individus avec maladie active et ceux en rémission endoscopique (**Figure 27A**), était corrélée au SES-CD parmi les individus avec maladie CD-B1 (**Figure 27B**).



**Figure 27. Expression du CD66b sur les eosinophiles circulants.**

A) Comparaison entre la MFI du CD66b sur les eosinophiles circulants selon l'activité de la maladie. Active disease :  $n = 57$ , Inactive disease :  $n = 16$ , Test U de Mann-Whitney. B) Corrélation entre la MFI du CD66b sur les eosinophiles circulants et le SES-CD dans le sous-groupe « Typical CD-B1 ». Coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$ .

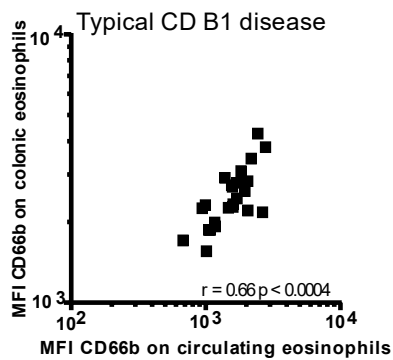
Tout comme avec les neutrophiles, l'expression du CD66b sur les eosinophiles était significativement supérieur au niveau du tissu comparativement au sang et ce, seulement parmi les individus avec maladie active. Par contre, il n'y avait aucune différence entre les individus avec maladie active et les contrôles (**Figure 28**).



**Figure 28. Expression du CD66b sur les eosinophiles coliques et circulants selon le comportement de la maladie.**

Sont représentées sur cet histogramme les MFI du CD66b sur les eosinophiles de la muqueuse colique (sphères) et en circulation (X) B1 : n = 40, B2 or B3 : n = 17, Healthy controls muqueuse colique: n = 10, sang : n = 16. Test de Kruskal-Wallis (p = NS) pour les comparaisons selon le comportement et les contrôles sains. Test de Wilcoxon pour échantillons appariés (+) (contrôles sains, n = 10 pour cette analyse) +++ p < 0.001, ++++ p < 0.0001.

Enfin, tel qu'observé parmi les neutrophiles, l'expression du CD66b sur les eosinophiles du sang et de la muqueuse colique était positivement corrélée au sein de l'ensemble de la cohorte ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.0001$ ) et plus spécifiquement, du sous-groupe d'individus avec maladie CD-B1. (**Figure 29**)

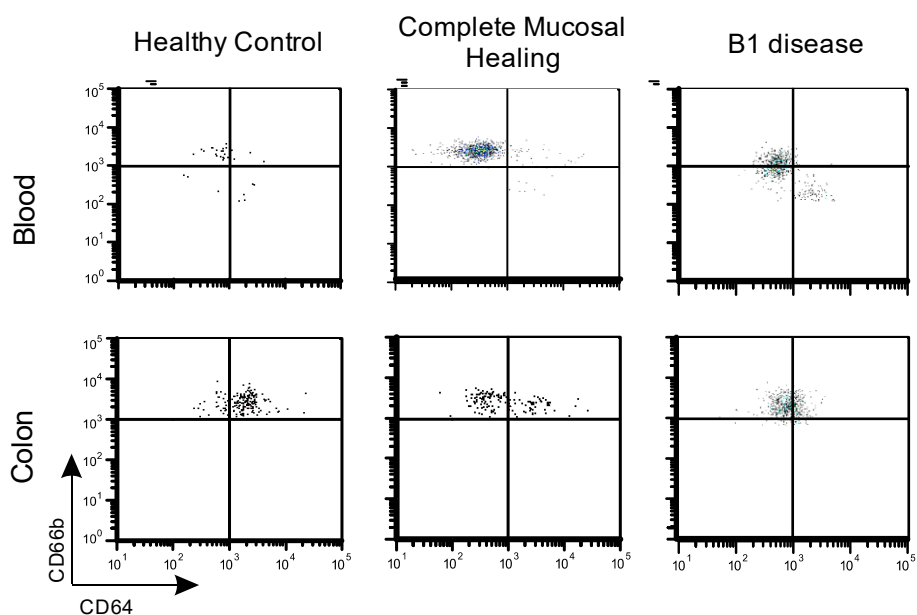


**Figure 29. Corrélation entre l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants et coliques parmi les individus avec phénotype endoscopique typique et maladie B1.**

Coefficient de corrélation de Spearman,  $n = 25$



Nos analyses de cytométrie de flux ont démontré l'expression du CD64 sur des eosinophiles circulants et coliques, et même deux niveaux d'expression chez certains patients (Figure 30).



**Figure 30.** « Dot plot » représentatif de l'expression du CD64 et du CD66b sur les eosinophiles du sang et du colon selon l'activité de la maladie.

Graphiques représentant les eosinophiles étant Live-dead<sup>neg</sup> CD45<sup>+</sup> SSC<sup>high</sup> CD66b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup>/FcεRI<sup>+</sup>

Cependant, cette expression n'était pas différente en présence de maladie active comparativement aux individus en rémission endoscopique ou aux contrôles sains. L'unique corrélation observée avec la sévérité de la maladie était au niveau de l'expression du CD64 sur les eosinophiles circulants parmi le groupe nouvellement diagnostiqué (Tableau VII).

**Tableau VII. Corrélations entre l'expression du CD66b et du CD64 sur les eosinophiles circulants et coliques et le SES-CD selon les sous-groupes.**

	CD66b eosinophiles circulants	CD64 eosinophiles circulants	CD66b eosinophiles muqueuse	CD64 eosinophiles muqueuse
Ensemble de la cohorte active (n = 57) †	r = 0.15	r = 0	r = 0.12	r = -0.17
Aspect endoscopique typique CD (n = 42) †	r = 0.28	r = -0.05	r = 0.23	r = -0.28
Individus avec maladie B1 (n = 40) †	r = 0.21	r = 0	r = 0.12	r = -0.08
Maladie B1 et aspect endoscopique typique CD (n = 25) ‡	<b>r = 0.47</b> <b>p &lt; 0.02</b>	r = -0.16	r = 0.28	r = -0.20
UC-like (n = 15) ‡	r = -0.31	r = -0.09	r = 0.03	r = 0.06
Nouveaux diagnostics (n = 15) ‡	r = 0.07	<b>r = 0.54</b> <b>p &lt; 0.04</b>	r = 0.02	r = 0.36
Aucun traitement dans le dernier mois (n = 14) ‡	r = 0.06	r = -0.33	r = -0.31	r = -0.44
Traitement non biologique (n = 14) ‡	r = 0.14	r = -0.15	r = 0.32	r = -0.52 p < 0.06
Traitement biologique (n = 14) ‡	r = 0.14	r = 0.03	r = -0.14	r = 0.19

†Corrélation de Pearson

‡ Corrélation de Spearman

En résumé, en dépit du fait que le potentiel d'activation des eosinophiles circulants exprimé par le CD66b ne soit pas augmenté en maladie active, celui-ci était corrélé avec la sévérité endoscopique parmi les individus avec maladie B1 et phénotype endoscopique typique de maladie de Crohn.

Avant d'entreprendre la prochaine section, voici un rappel des corrélations significatives observées jusqu'à présent (**Tableau VIII**).

**Tableau VIII. Résumé des corrélations observées entre les fréquences cellulaires et marqueurs d'activation et le SES-CD**

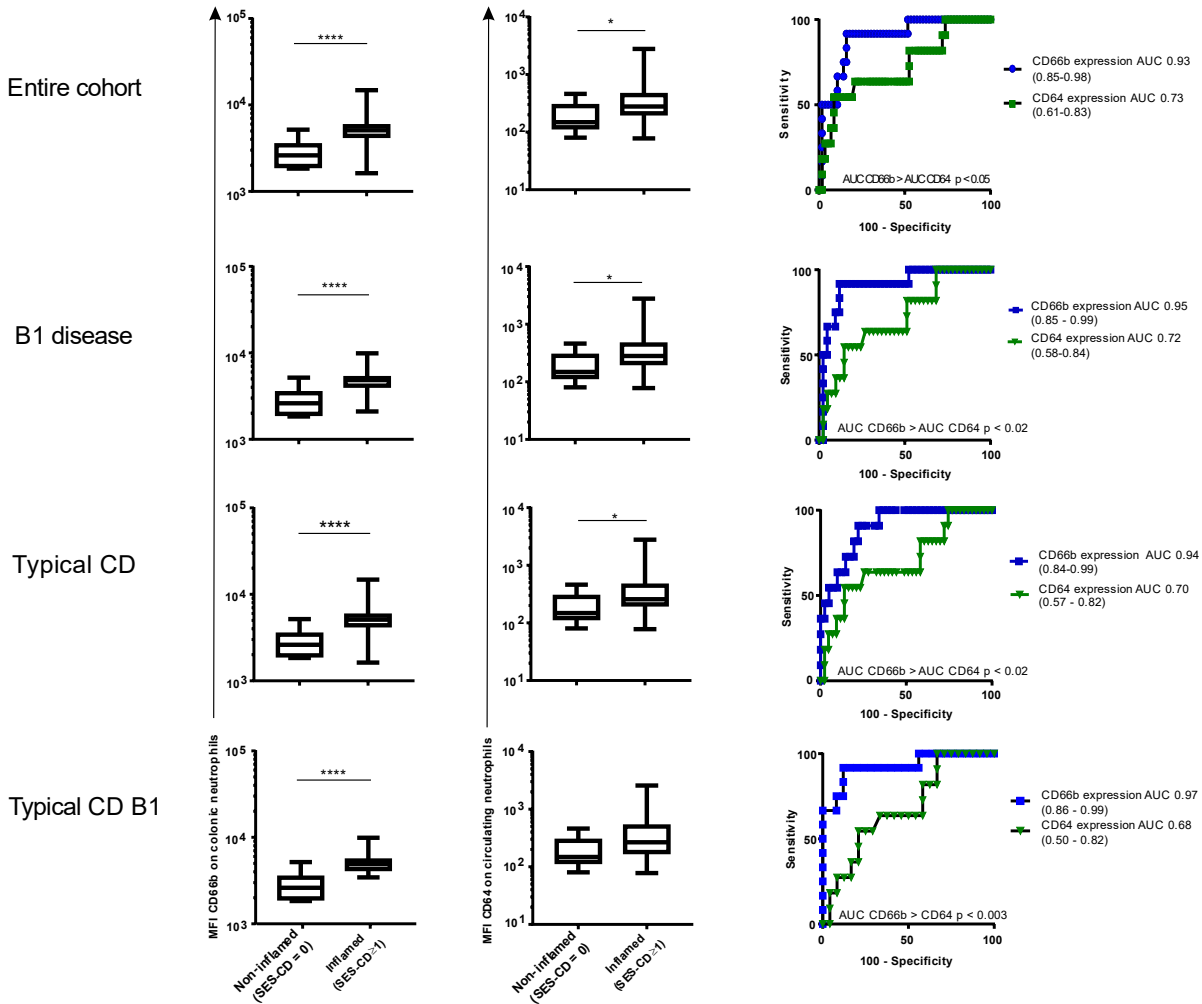
Paramètres	UC-like	CD typique	Maladie B1	Maladie CD-B1	Nouveaux diagnostics	Pas de traitement récent
% neutrophiles coliques	✓		✓			
% eosinophiles circulants		✓				✓
CD66b sur les neutrophiles coliques			✓	✓		
CD64 sur les neutrophiles circulants		✓	✓	✓	✓	
CD66b sur les eosinophiles circulants				✓		
CD64 sur les eosinophiles circulants					✓	

L'utilisation d'un petit ✓ infère une corrélation possiblement influencée par un autre paramètre.

## Scores d'activation granulocytaire pour évaluer la sévérité de la maladie

Atteindre une guérison complète de la muqueuse étant un prédicteur de rémission soutenue<sup>173</sup>, nous avons dans un deuxième temps évalué la performance des marqueurs d'activation granulocytaire pour discriminer les individus avec une muqueuse strictement non inflammatoire (guérison muqueuse complète, SES-CD=0) des individus avec une muqueuse démontrant des signes d'inflammation (SES-CD  $\geq 1$ ). Ce dernier groupe incluait donc les 4 individus avec SES-CD = 1-2 qui étaient considérés en rémission endoscopique mais qui témoignaient tout de même des signes d'inflammation au sein d'un segment colique. Ces 4 individus ont été inclus dans les analyses impliquant la cohorte complète et 3 d'entre eux dans les analyses du sous-groupe B1.

L'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants était significativement plus élevée parmi les individus avec SES-CD  $\geq 1$ , comparativement aux individus avec SES-CD = 0 (**Figure 31**). Cette différence entre l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques était marquée pour l'ensemble de la cohorte ainsi que chaque sous-groupe, alors que celle entre l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants était généralement plus faible et même absente dans le sous-groupe avec maladie CD-B1. Ainsi, en examinant tous les sous-groupes ainsi que l'ensemble de la cohorte, on remarque que la performance de l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques était supérieure à celle du CD64 sur les neutrophiles circulants pour distinguer la guérison muqueuse complète de l'inflammation muqueuse macroscopique (**Figure 31, Tableau IX**).



**Figure 31. Expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants selon la présence de guérison muqueuse complète.**

Deux premières colonnes : comparaison entre l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles des individus avec guérison muqueuse complète (SES-CD = 0; n=12) et avec inflammation macroscopique de la muqueuse (SES-CD ≥ 1; Entire cohort n = 61 B1 disease: SES-CD ≥ 1 n = 43 Typical CD: SES-CD ≥ 1 n = 42 Typical CD-B1 SES-CD ≥ 1 n = 25) Test U de Mann-Whitney; Colonne de droite : Courbes ROC illustrant la performance de ces marqueurs pour distinguer les individus avec guérison muqueuse complète. Comparaison entre les aires sous la courbe selon le test de Delong. \*  $p < 0.05$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$

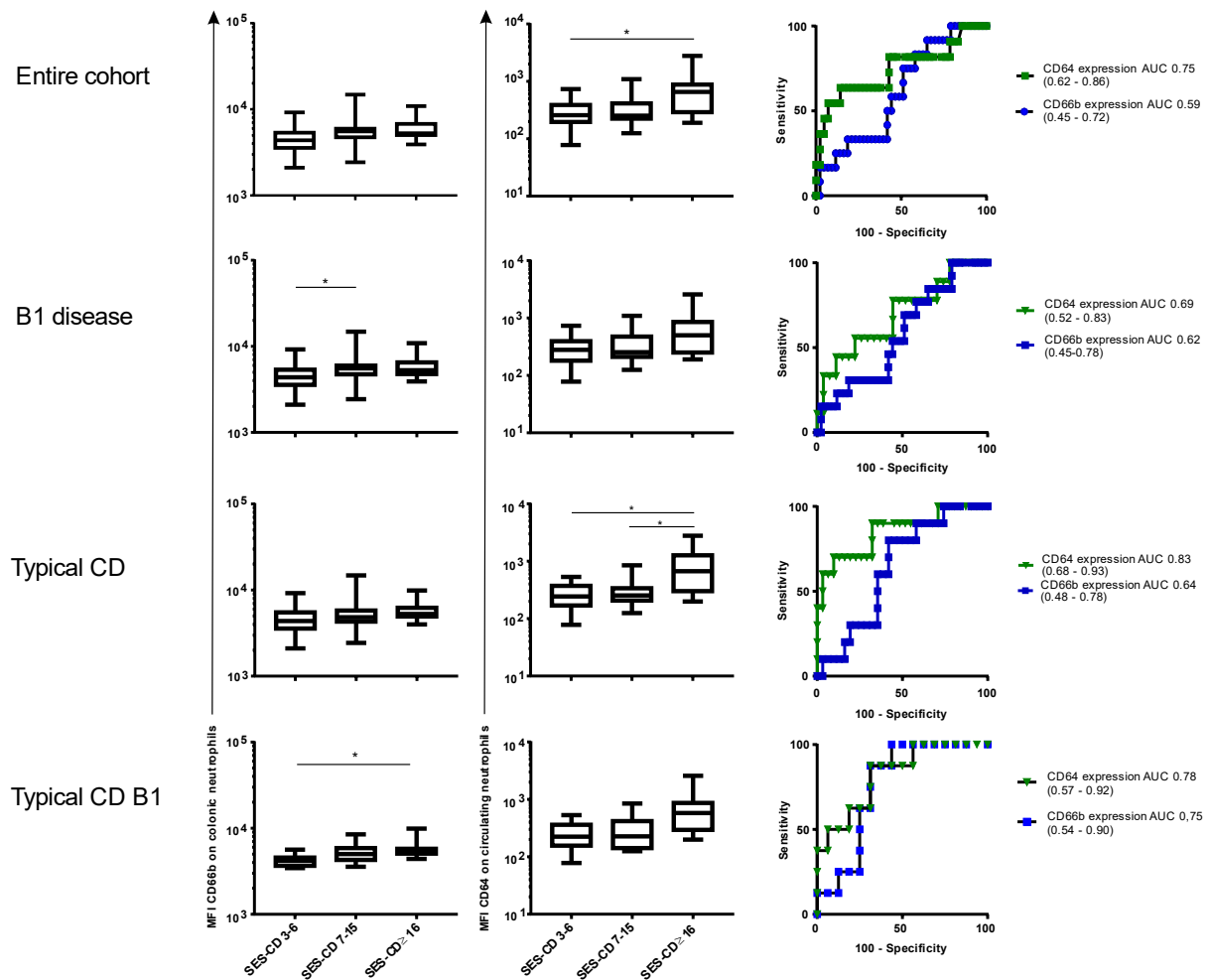
**Tableau IX. Performances du CD66b et du CD64 pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète**

	CD66b neutrophiles coliques				CD64 neutrophiles circulants			
	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Cohorte entière	0.93*	< 3647	91,7	85.3	0.73*	<150.5	54.6	90
Maladie B1	0.95*	< 3721	91.7	88.1	0.72*	<155.5	54.6	85.4
Maladie endoscopique typique CD	0.94*	<3647	91.7	83.3	0.70*	< 150.5	54.6	86.4
Maladie CD-B1	0.97**	< 3721	91.7	88.0	0.68**	<155.5	54.6	80.0

Comparaison entre les AUC du CD66b et du CD64 à l'aide du test Delong, \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

Les seuils ont été calculé à l'aide de l'Index de Youden

La performance des marqueurs d'activation des granulocytes fut ensuite évaluée pour discriminer les individus avec maladie endoscopique sévère ( $SES-CD \geq 16$ ) de ceux avec maladie légère à modérée, une maladie endoscopique sévère étant prédicteur de mauvais pronostic<sup>184, 185</sup>. Dans ce cas, la performance du CD66b sur les neutrophiles coliques était inconstante pour discriminer la sévérité de la maladie, alors que celle du CD64 sur les neutrophiles circulants n'était discriminante que dans le sous-groupe avec phénotype endoscopique CD typique, sans toutefois démontrer une performance supérieure à celle du CD66b sur les neutrophiles coliques (**Figure 32 et Tableau X**). L'utilisation individuelle de ces paramètres s'est donc avérée sous-optimale pour discriminer la maladie endoscopique sévère.



**Figure 32. Expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants selon la sévérité endoscopique de la maladie.**

Deux premières colonnes : Comparaison de l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles selon la sévérité de la maladie. Test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Entire cohort n = 57 B1 disease n = 40 Typical CD n = 42 Typical CD-B1 n = 25. Colonne de droite : Courbes ROC illustrant la performance de ces marqueurs pour distinguer les individus avec maladie endoscopique sévère. Comparaison entre les aires sous la courbe selon le test de Delong. \* p < 0.05

**Tableau X. Performances du CD66b et du CD64 pour discriminer les individus avec maladie endoscopique sévère**

	CD66b neutrophiles coliques				CD64 neutrophiles circulants			
	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Cohorte entière	0.59	>5244	58.3	55.8	0.75	>483	63.6	85.7
Maladie B1	0.62	>5015	53.9	47.7	0.69	>480	55.6	75.0
Maladie endoscopique typique CD	0.64	>4874	80.0	58.1	0.83	>483	70.0	90.3
Maladie CD-B1	0.75	>4874	87.5	68.8	0.78	>267	87.5	68.8

Les seuils ont été calculé à l'aide de l'Index de Youden

Nous avons donc élaboré un « score d'activation neutrophilique » qui combinait les deux marqueurs d'activation (CD66b sur les neutrophiles coliques X CD64 sur les neutrophiles circulants) pour évaluer la sévérité de la maladie. Ce score était corrélé avec la sévérité endoscopique dans tous les sous-groupes, à l'exception des individus avec phénotype endoscopique « UC-like » (**Tableau XI**).



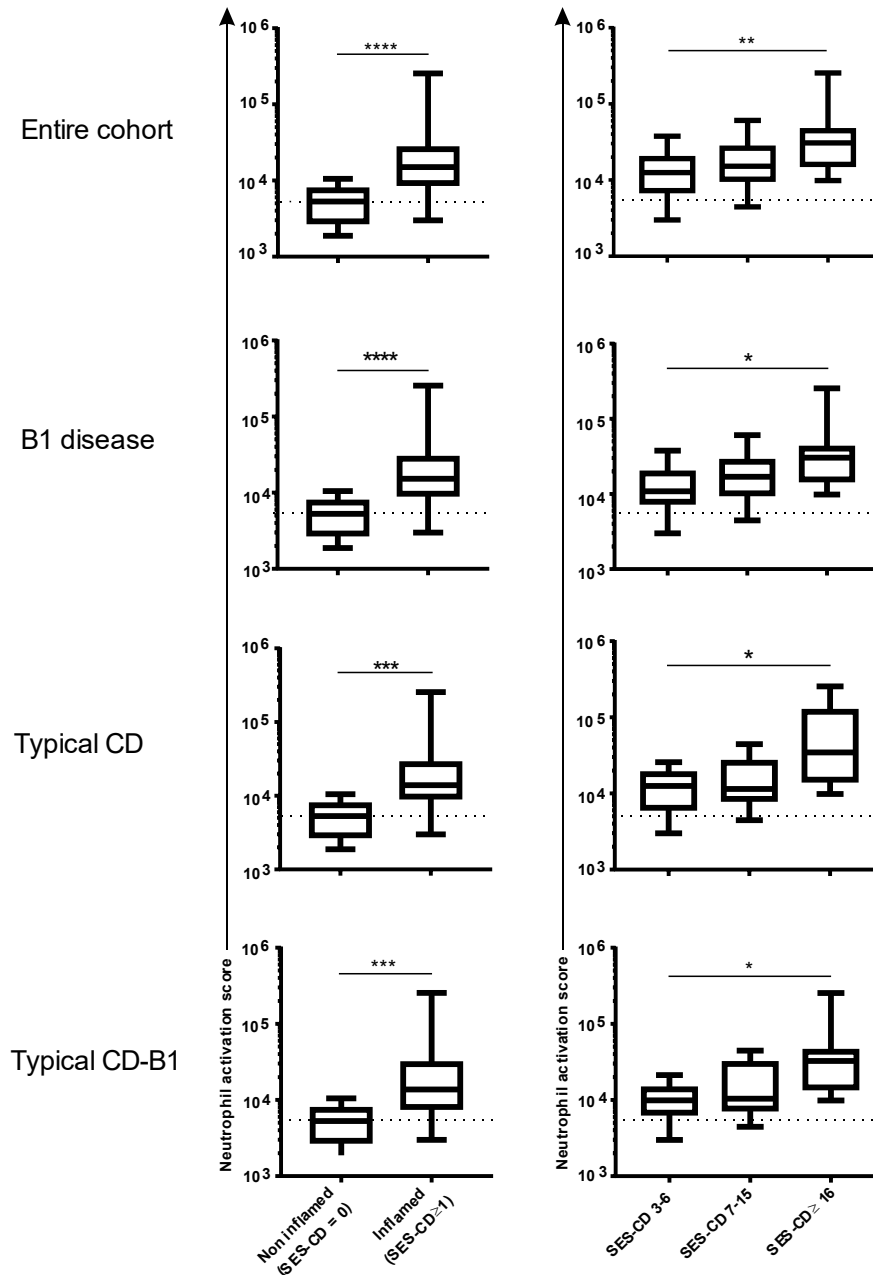
**Tableau XI. Corrélations entre l'expression des marqueurs d'activation individuels, ainsi que le score d'activation neutrophilique et le SES-CD.**

	MFI du CD64 sur les neutrophiles circulants	MFI du CD66b sur les neutrophiles coliques	Score d'activation neutrophilique
<b>Maladie active † (n = 57)</b>	<b>r = 0.38</b> <b>p &lt; 0.005</b>	r = 0.15	<b>r = 0.37</b> <b>p &lt; 0.006</b>
<b>Phénotype endoscopique UC- like ‡ (n = 15)</b>	r = 0.07	r = 0.25	r = 0.35
<b>Phénotype endoscopique typique † (n = 42)</b>	<b>r = 0.43</b> <b>p &lt; 0.005</b>	r = 0.13	<b>r = 0.41</b> <b>p &lt; 0.007</b>
<b>Maladie active B1 † (n = 40)</b>	<b>r = 0.36</b> <b>p &lt; 0.03</b>	<b>r = 0.34</b> <b>p &lt; 0.04</b>	<b>r = 0.36</b> <b>p &lt; 0.03</b>
<b>Maladie typique CD-B1 ‡ (n = 25)</b>	<b>r = 0.41</b> <b>p &lt; 0.05</b>	<b>r = 0.50</b> <b>p &lt; 0.02</b>	<b>r = 0.46</b> <b>p &lt; 0.02</b>

†Corrélation de Pearson

‡ Corrélation de Spearman

Ensuite, tel qu'illustré à la **Figure 33 et au Tableau XII**, le score d'activation neutrophilique démontrait une performance constante pour discriminer les individus avec guérison complète de la muqueuse des individus avec inflammation macroscopique, avec des sensibilités supérieures à 90% ainsi que les patients avec maladie endoscopique sévère, avec des spécificités supérieures à 85%.



**Figure 33. Score d'activation neutrophilique.**

Colonne de gauche : Comparaison entre le score d'activation neutrophilique des individus en guérison muqueuse complète (n = 12) et des individus avec SES-CD  $\geq 1$  (Cohorte entière : n = 61, maladie B1 : n = 43, Typical CD : n = 42, Typical CD-B1 : n = 25), Test U de Mann-Whitney. Colonne de droite : comparaison entre le score d'activation neutrophilique en fonction de la sévérité endoscopique de la maladie (entire cohort : n = 57, Maladie B1 : n = 40, Typical CD : n = 42, Typical CD-B1 : n = 25, test Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn). La ligne pointillée représente la médiane du groupe en guérison muqueuse complète. \* p < 0.05 \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001 \*\*\*\* p < 0.0001

**Tableau XII. Performances du score d'activation neutrophilique pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète et ceux avec maladie endoscopique sévère**

	Guérison muqueuse complète				Maladie endoscopique sévère			
	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Cohorte entière	0.90	<8754	90.9	75.9	0.78	>29373	63.6	86.1
Maladie B1	0.91	<9190	90.9	77.5	0.76	>29373	60.0	85.7
Maladie endoscopique typique CD	0.90	<8754	90.9	78.6	0.82	>28254	66.7	87.1
Maladie CD-B1	0.87	<9190	90.9	69.2	0.83	>26359	62.5	86.7

Les seuils ont été calculé à l'aide de l'Index de Youden

Afin d'optimiser la prise en charge des individus atteints de maladie de Crohn, nous avons souhaité élaborer un score sanguin qui pourrait servir de biomarqueur pour distinguer la sévérité endoscopique des individus. Compte tenu que l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants était corrélée au SES-CD, nous l'avons combiné à l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants pour former le « score d'activation granulocytaire sanguin ». Ce score offrait de meilleures corrélations avec la sévérité de la maladie parmi les sous-groupes avec maladie endoscopique CD typique (**Tableau XIII**).

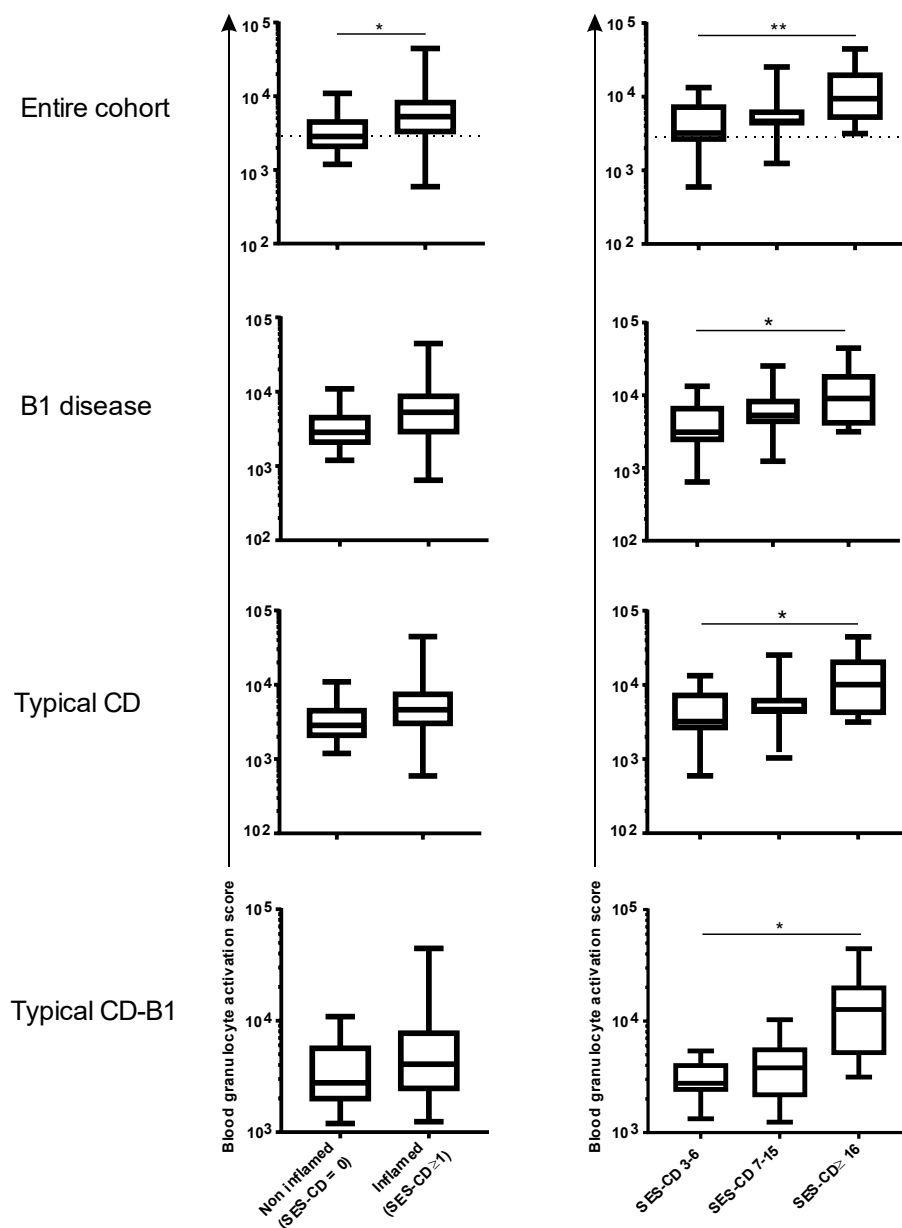
**Tableau XIII. Corrélations entre l'expression des marqueurs d'activation individuels, ainsi que le score d'activation granulocytaire sanguin et le SES-CD.**

	MFI du CD64 sur les neutrophiles circulants	MFI du CD66b sur les eosinophiles circulants	Score d'activation granulocytaire sanguin
<b>Maladie active † (n = 57)</b>	<b>r = 0.38</b> <b>p &lt; 0.005</b>	r = 0.15	<b>r = 0.42</b> <b>p &lt; 0.002</b>
<b>Phénotype endoscopique UC-like ‡ (n = 15)</b>	r = 0.07	r = -0.31	r = -0.02
<b>Phénotype endoscopique typique † (n = 42)</b>	<b>r = 0.43</b> <b>p &lt; 0.005</b>	r = 0,28	<b>r = 0.54</b> <b>p &lt; 0.0004</b>
<b>Maladie active B1 † (n = 40)</b>	<b>r = 0.36</b> <b>p &lt; 0.03</b>	r = 0.21	<b>r = 0.40</b> <b>p &lt; 0.02</b>
<b>Maladie typique CD-B1 ‡ (n = 25)</b>	<b>r = 0.41</b> <b>p &lt; 0.05</b>	<b>r = 0.47</b> <b>p &lt; 0.02</b>	<b>r = 0.55</b> <b>p &lt; 0.005</b>

†Corrélation de Pearson

‡ Corrélation de Spearman

Dans l'ensemble de la cohorte, les patients en guérison muqueuse complète étaient distingués de ceux avec inflammation, ainsi que ceux avec maladie endoscopique sévère vs légère à modérée (**Figure 34**), notamment avec une spécificité supérieure à 90% parmi les groupes d'individus avec phénotype endoscopique typique CD (**Tableau XIV**).



**Figure 34. Score d'activation granulocytaire sanguin.**

Colonne de gauche : Comparaison entre le score d'activation granulocytaire sanguin des individus en guérison muqueuse complète (n = 12) et des individus avec SES-CD  $\geq 1$  (Cohorte entière : n = 61, maladie B1 : n = 43, Typical CD : n = 42, Typical CD-B1 : n = 25), Test U de Mann-Whitney. Colonne de droite : comparaison entre le score d'activation granulocytaire sanguin en fonction de la sévérité endoscopique de la maladie (entire cohort : n = 57, Maladie B1 : n = 40, Typical CD : n = 42, Typical CD-B1 : n = 25, test Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn). La ligne pointillée représente la médiane du groupe en guérison muqueuse complète. \* p < 0.05 \*\* p < 0.01

**Tableau XIV. Performances du score d'activation granulocytaire sanguin pour discriminer les individus avec guérison muqueuse complète et ceux avec maladie endoscopique sévère**

	Guérison muqueuse complète				Maladie endoscopique sévère			
	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	AUC	Seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Cohorte entière	0.70	<4995	81.8	53.3	0.78	>7694	75.0	81.4
Maladie B1	0.69	<3536	72.7	69.1	0.75	>7658	70.0	78.6
Maladie endoscopique typique CD	0.67	<3528	72.7	65.9	0.85	>7694	77.8	90.3
Maladie CD-B1	0.63	<3742	72.7	53.9	0.88	>6863	75.0	93.7

Les seuils ont été calculé à l'aide de l'Index de Youden

## Corrélations avec la sévérité endoscopique en fonction de la localisation de la maladie

Nous avons analysé les fréquences cellulaires et l'expression du CD66b et du CD64 sur les neutrophiles et les eosinophiles à partir de biopsies coliques et d'échantillons sanguins, en subdivisant notre cohorte selon le phénotype endoscopique et le comportement de la maladie, ainsi qu'en fonction des sous-groupes pré-établis pour le recrutement. Par contre, la moitié des participants avaient une atteinte iléale concomitante et il est plausible que nos résultats soient biaisés pour certains patients lorsque cette atteinte était importante, ayant analysé un segment colique moins atteint. Nous avons donc stratifié à nouveau notre cohorte, cette fois, en fonction de la localisation colique ou iléocolique de la maladie.

Surprenamment, aucune des corrélations impliquant le CD64 sur les neutrophiles circulants, le CD66b sur les eosinophiles circulants et sur les neutrophiles coliques n'a été maintenue selon cette stratification (**Tableau XV**). Par contre, nous avons observé une forte corrélation entre les eosinophiles circulants et la sévérité de la maladie au sein des individus avec maladie iléocolique active. Une nouvelle corrélation impliquant les basophiles coliques est également présente dans ce groupe. Dans le sous-groupe avec maladie exclusivement colique, une nouvelle corrélation impliquant le CD64 sur les neutrophiles coliques fut observée. La corrélation du score d'activation neutrophilique fut préservée, alors que le score d'activation granulocytaire sanguin n'était corrélé avec la sévérité de la maladie que parmi les individus avec maladie iléocolique. On observe donc des corrélations différentes entre les divers paramètres et la sévérité endoscopique selon la localisation de la maladie, avec des marqueurs circulants en maladie iléocolique et des paramètres muqueux en maladie colique.

**Tableau XV. Corrélations entre les différents paramètres et le SES-CD selon la localisation de la maladie**

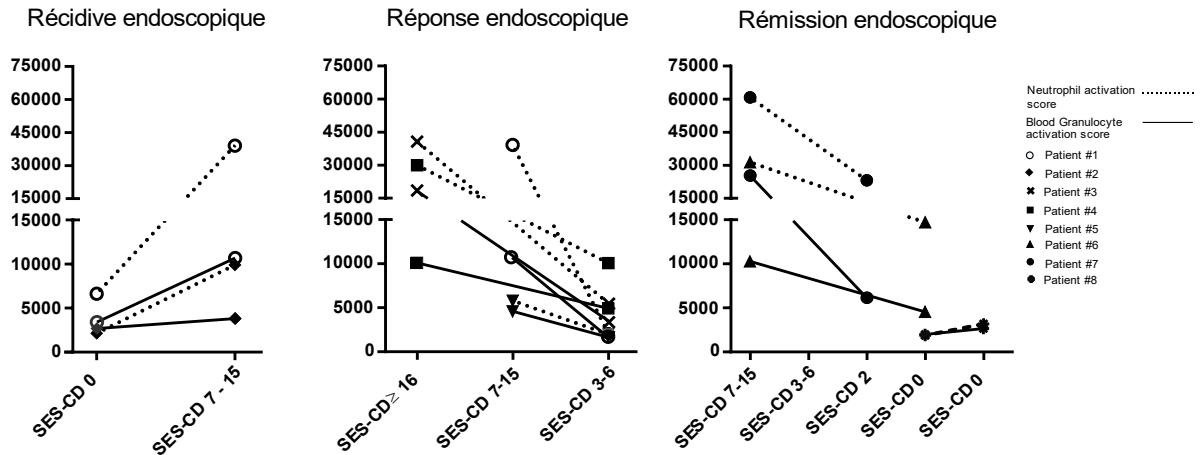
	Maladie colique (L2) n = 29	Maladie iléocolique (L3) n = 28
% neutrophiles circulants	r = -0.03	r = -0.09
% neutrophiles muqueuse	r = 0.14	r = 0.35
% eosinophiles circulants	r = 0.01	<b>r = 0.56 p &lt; 0.02</b>
% eosinophiles muqueuse	r = 0.08	r = 0.29
% basophiles circulants	r = -0.18	r = -0.01
% basophiles muqueuse	r = 0.04	<b>r = 0.40 p &lt; 0.05</b>
% mastocytes	r = -0.28	r = 0.20
MFI CD64 neutrophiles circulants	r = 0.23	r = 0.26
MFI CD66b neutrophiles circulants	r = 0.13	r = 0.22
MFI CD66b neutrophiles muqueuse	r = 0.21	r = 0.32
MFI CD64 neutrophiles muqueuse	<b>r = 0.38 p &lt; 0.05</b>	r = -0.11
MFI CD66b eosinophiles circulants	r = 0.10	r = 0.19
MFI CD64 eosinophiles circulants	r = -0.03	r = 0.26
MFI CD66b eosinophiles muqueuse	r = -0.002	r = 0.19
MFI CD64 eosinophiles muqueuse	r = -0.01	r = -0.35
Score d'activation neutrophilique	<b>r = 0.40 p &lt; 0.05</b>	r = 0.35
Score d'activation granulocytaire sanguin	r = 0.30	<b>r = 0.42 p &lt; 0.02</b>

Coefficient de correlation de Spearman



## Évaluation longitudinale des scores d'activation granulocytaires

Nous avons finalement voulu déterminer comment les scores d'activation modulaient selon l'évolution de la maladie chez un même patient. Les 73 individus de la cohorte ont bénéficié d'un suivi clinique au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. 10 participants ont donné des prélèvements lors d'une coloscopie de suivi, incluant 5 individus diagnostiqués au moment de leur inclusion dans l'étude (**Figure 35**). La période moyenne de suivi était de 15.3 (SD 7.4) mois. Une patiente a accepté de fournir des échantillons sanguins et tissulaires à trois moments différents (Patiente #1). Nous avons observé une augmentation significative des deux scores chez deux patients ayant rechuté, une diminution significative parmi 4 individus avec réponse endoscopique ainsi que 2 individus avec rémission endoscopique. Une patiente ayant évolué d'une maladie active modérée vers une guérison muqueuse complète a tout de même démontré un score d'activation neutrophilique encore élevé (patiente #6). Ceci peut être le reflet d'une guérison récente chez cette patiente, considérant un délai de 9 mois seulement entre les deux coloscopies. Enfin, les scores de deux patientes sont demeuré stables; une patiente est restée en guérison muqueuse complète à 25 mois d'intervalle (patiente #8) et la seconde présentait initialement une maladie colique sténosante et lors de l'évaluation endoscopique 11 mois après la résection chirurgicale partielle colique, démontrait à nouveau une inflammation de la muqueuse colique (ce dernier cas n'est pas représenté sur la figure 35). La seule patiente avec une discordance entre les scores et le score endoscopique avait présenté une augmentation significative de la MFI du CD64 sur les neutrophiles circulants malgré une stabilité du score endoscopique dans un intervalle de un an. Il n'y avait pas d'évidence d'infection et elle a bien évolué sous anti-TNF par la suite (cas non représenté sur la figure 35).



**Figure 35. Variation des scores en fonction de l'évolution de la maladie.**

Variation du score d'activation neutrophilique (ligne pointillée) et du score d'activation granulocytaire sanguin (ligne pleine). Les patients #1 et #2 avaient une récurrence clinique et endoscopique au moment de leur coloscopie de contrôle (gauche), les patients #1,3,4,5 ont démontré une réponse endoscopique (diminution de plus de 50% du SES-CD) (milieu), les patients #6 et #7 ont présenté une rémission endoscopique et le patient #8 est demeuré en guérison muqueuse complète. Les patients # 3,4,5,et 7 étaient nouvellement diagnostiqués.

Les données présentées illustrent un potentiel à utiliser les scores d'activation pour l'évaluation et le suivi de l'activité et de la sévérité de la maladie de Crohn.

## Discussion

Les granulocytes sont détectés dans la muqueuse inflammée en maladie de Crohn <sup>10</sup>, mais leur contribution à la pathogenèse et à la sévérité de la maladie demeure méconnue. Ce travail a démontré que l'expression du CD66b sur les neutrophiles augmentait seulement dans les tissus inflammés d'individus avec maladie de Crohn, alors que l'expression du CD64 était augmentée sur les neutrophiles circulants seulement dans le contexte d'une maladie active. Nous avons par la suite établi une corrélation entre le SES-CD et l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques mais non circulants, et inversement, l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants mais non muqueux parmi les individus avec maladie active de type B1. De plus, la fréquence des neutrophiles était accrue au sein du colon inflammé, mais non corrélée avec le SES-CD, à l'exception du sous-groupe avec phénotype endoscopique UC-like. Un score d'activation neutrophilique combinant l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et du CD64 sur les neutrophiles circulants permettait de discriminer les individus avec guérison muqueuse complète de ceux avec des signes d'inflammation évalués par l'endoscopie. Plus particulièrement, ce score permettait de différencier les individus avec maladie endoscopique sévère de ceux avec une maladie légère à modérée. Étant donné que l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants était aussi corrélée avec le SES-CD parmi les individus avec maladie B1 et phénotype endoscopique typique, nous avons proposé un score d'activation granulocytaire sanguin (CD64 sur les neutrophiles X CD66b sur les eosinophiles) qui évaluait aussi bien que le score d'activation neutrophilique l'inflammation de la muqueuse et permettait le suivi de l'évolution de la sévérité de la maladie, offrant une utilité clinique potentielle.

Cette étude présentait une cohorte de patients atteints de maladie de Crohn dont les caractéristiques cliniques et endoscopiques sont bien détaillées, avec une revue extensive du dossier médical pour confirmer le diagnostic, l'activité de la maladie ou la rémission et excluait tout individu avec suspicion d'infection ou comorbidité auto-immune. Même s'il offre une bonne concordance interobservateur <sup>186</sup>, le SES-CD fut effectué la plupart du temps par la

même personne, permettant également l'observation de certaines particularités endoscopiques, notamment l'apparence UC-like. De plus, les analyses de cytométrie de flux étaient exécutées indépendamment en parallèle par un second analyste aveugle du statut clinique des patients.

### 1. L'activation et non la fréquence des neutrophiles est corrélée avec la sévérité de la maladie de Crohn

Les corrélations observées avec l'expression de marqueurs d'activation sur les neutrophiles plutôt qu'avec leur fréquence nous permettent de postuler une implication de l'activation des neutrophiles circulants et coliques et non de leur nombre dans la sévérité de la maladie avec phénotype typique, qui excluait les maladies présentant une forme « UC-like » que nous discuterons ultérieurement.

Nous avons opté pour le CD15 et le CD66b pour l'identification des neutrophiles sur la base d'études précédentes qui avaient investigué leur rôle en maladie de Crohn <sup>15, 16, 107</sup>, et avons validé l'identification de ces cellules avec une évaluation morphologique des granulocytes purifiés (**Figure 1**). Cependant, aucune des études précédentes n'avait évalué la fréquence cellulaire et le niveau d'expression du CD66b sur ces neutrophiles dans le sang et dans la muqueuse en fonction de la sévérité endoscopique de la maladie. Notre étude montre pour la première fois, à notre connaissance, une corrélation entre l'expression du CD66b sur les neutrophiles de la muqueuse colique et la sévérité endoscopique de la maladie.

Le CD66b est une glycoprotéine "glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchored glycoprotein" exprimée sur les neutrophiles et les éosinophiles <sup>83, 85</sup>. Dans des conditions normales, elle est faiblement exprimée sur les neutrophiles <sup>85</sup>. Son expression est stimulée par des produits bactériens comme le fMLP ainsi que le GM-CSF produit par plusieurs cellules au sein de la muqueuse, notamment les neutrophiles, monocytes, macrophages, Th17 pathogéniques, ILC3,

fibroblastes et cellules épithéliales<sup>15, 83, 187-189</sup>. Le galectin-3 est un ligand potentiel du CD66b, qui lorsque stimulé, potentialise l'adhésion de la cellule par le CD11b/CD18, sa dégranulation et la production de superoxydes ainsi que la relâche d'IL-8<sup>83-85, 88</sup>. Cette dernière fonction fut décrite spécifiquement chez le neutrophile<sup>88</sup>.

Le CD66b est considéré comme un marqueur d'activation des neutrophiles en état inflammatoire<sup>107, 109</sup>. On ignore cependant si l'expression de cette glycoprotéine est le reflet d'une pathogénécité augmentée du neutrophile en maladie de Crohn ou bien une conséquence de l'ampleur de l'inflammation et des dommages tissulaires, occasionnant une concentration élevée de GM-CSF et de fMLP.

En effet, bien que plusieurs théories portant sur l'immunodéficience et le recrutement dysfonctionnel des neutrophiles en maladie de Crohn aient été émises<sup>13, 14, 98, 99, 103</sup>, des auteurs contemporains proposent que le neutrophile aurait un rôle dans la pathogenèse de la maladie, entre autres, via la stimulation de l'immunité Th17<sup>15, 16</sup>. D'une part, on a observé parmi une cohorte pédiatrique atteinte de maladie de Crohn, une accumulation de neutrophiles produisant de l'IL-23 dans le colon inflammé<sup>16</sup>. Ces neutrophiles, de par leur récepteurs CXCR1 et CXCR2, seraient recrutés par l'IL-8, produit par diverses cellules présentes dans la muqueuse, notamment des cellules épithéliales et extraépithéliales<sup>15</sup>. Les auteurs ont d'ailleurs identifié deux sous-populations de neutrophiles circulants, une CD15<sup>+</sup>CD66b<sup>bright</sup> exprimant l'IL23, le CXCR1 et CXCR2 et une seconde CD15<sup>+</sup>CD66b<sup>dim</sup> n'exprimant pas l'IL-23 ni le CXCR2<sup>16</sup>. L'IL-23 joue un rôle clé dans le développement de cellules Th17 pathogéniques, dont la présence au sein de la muqueuse inflammée et l'implication dans la physiopathologie de la maladie de Crohn furent abondamment explorées dans les dernières années<sup>190</sup>. Bien que les cytokines produites par les Th17 soient impliquées dans l'homéostasie de la barrière intestinale, elles peuvent également stimuler la production de cytokines proinflammatoires par le milieu intestinal telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF $\alpha$ , ainsi que l'IL-8<sup>190, 191</sup>. De plus, les cellules Th17/Th1 pathogéniques présentes en maladie de Crohn produisent également de

l'IFN $\gamma$ <sup>190</sup>. Une seconde étude récente a d'ailleurs démontré des interactions entre ces cellules Th17 pathogéniques, les cellules épithéliales et fibroblastes coliques ainsi que les neutrophiles exprimant fortement le CD66b; les cellules Th17 pathogéniques contribueraient au recrutement des neutrophiles au sein de la muqueuse via la sécrétion d'IL-8 et à leur activation, entre autres via la production de GM-CSF, de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ <sup>15</sup>. Les neutrophiles stimuleraient en contrepartie l'immunité Th17 via la production de CCL2 et de CCL20<sup>15</sup>. Ces données militent en faveur d'une population de neutrophiles exprimant le CD66b qui contribuerait au maintien des réponses immunitaires Th17. Nous n'avons toutefois pas évalué l'expression des CXCR1 et CXCR2 sur les neutrophiles, le début de notre étude antédant la publication de ces observations<sup>16</sup>.

En revanche, d'autres ont proposé que l'expression du CD66b sur le neutrophile serait un signe de dysfonction neutrophilique en sepsis, avec altération de la capacité de phagocytose et du burst oxydatif<sup>110</sup>. Tel que précédemment évoqué, cette incapacité des neutrophiles à assurer le maintien de la barrière intestinale contribuerait alors au recrutement et à l'activation de macrophages et de cellules de l'immunité adaptative dans la muqueuse<sup>103</sup>. N'ayant pas procédé à des études fonctionnelles sur les neutrophiles coliques exprimant fortement le CD66b dans notre cohorte, des études ultérieures seront nécessaires pour expliquer la corrélation observée avec le SES-CD. Ces considérations physiopathologiques ne changent toutefois pas l'utilité que nous avons démontrée pour discriminer à l'aide de ce marqueur les individus avec guérison muqueuse complète de ceux avec inflammation macroscopique (**Figure 31**).

Il est à souligner que nous n'avons pas observé de corrélation entre les fréquences des neutrophiles dans le sang ainsi que dans la muqueuse et le SES-CD, à l'exception du sous-groupe de patients avec phénotype endoscopique UC-like (**Tableau IV**). Historiquement, les études s'intéressant à la fréquence des neutrophiles en maladie de Crohn étaient qualitatives, semi-quantitatives ou impliquaient des marqueurs indirects de leur présence, telle que la

calprotectine fécale<sup>49, 104, 105, 107</sup>. Les techniques récentes de « single-cell analysis » ont permis des analyses plus spécifiques et même l'identification de sous-populations de neutrophiles<sup>16, 108, 192</sup>. Par ailleurs, deux populations de neutrophiles circulants et muqueux ont été récemment discriminés selon leur expression de CD177 parmi des individus avec maladie inflammatoire intestinale colique active. Les neutrophiles exprimant le CD177 produisaient moins de cytokines proinflammatoires et davantage d'IL-22 et de TGF- $\beta$ . Leur activité bactéricide était accrue, notamment via une augmentation de la production de radicaux libres, myeloperoxidase et la formation de « NET ». La proportion de neutrophiles CD177+ était également corrélée au CDAI parmi les individus avec maladie de Crohn active évaluée par l'endoscopie<sup>108</sup>. Il serait plausible que diverses sous-populations de neutrophiles circulants et tissulaires jouent des rôles différents dans la physiopathologie de la maladie de Crohn et/ou que ce n'est pas leur fréquence globale, mais plutôt leur activité qui soit corrélée avec la sévérité de la maladie.

Par contre, les neutrophiles infiltraient significativement la muqueuse colique en présence d'une maladie active, peu importe le comportement et phénotype endoscopique de la maladie (**Figures 7 et 8**). Il est possible que la corrélation entre le SES-CD et la fréquence des neutrophiles au sein de la muqueuse parmi les individus avec phénotype endoscopique UC-like témoigne d'une inflammation histologique continue comparativement à la maladie de Crohn typique présentant spécifiquement une infiltration discontinue<sup>30</sup>. De plus, tel que précédemment décrit en colite ulcéreuse, lorsque comparé exclusivement au sous-groupe avec phénotype endoscopique typique, le groupe UC-like présentait une proportion supérieure non seulement de neutrophiles, mais également d'éosinophiles au sein de la muqueuse colique inflammatoire<sup>60, 107, 193</sup>. En contrepartie, nous n'avons pas observé une expression supérieure du CD66b sur les neutrophiles des individus avec phénotype UC-like, comparativement à ce qui fut observé par Lampinen et collègues sur les neutrophiles en colite ulcéreuse active comparativement à ceux en maladie de Crohn<sup>107</sup>.

## 2. Les participants avec phénotype UC-like étaient-ils atteints d'une colite ulcéreuse?

La distinction clinique entre la colite de Crohn et la colite ulcéreuse peut être difficile chez certains patients naïfs au traitement <sup>26</sup>. De plus, les traitements employés en colite ulcéreuse peuvent mener à une atteinte discontinue de la muqueuse et mimer la maladie de Crohn <sup>18, 29, 194</sup>. Cependant, plusieurs caractéristiques de notre sous-groupe « UC-like » nous permettent de considérer que ces patients étaient atteints d'une maladie de Crohn, notamment la présence de granulome et d'iléite chronique à l'évaluation histologique, d'une maladie périanale, d'une atteinte du tube digestif haut, d'une atteinte prédominante au colon droit, segmentaire ou d'une épargne du rectum sans traitement récent <sup>18, 28, 29</sup>. Certaines de ces caractéristiques peuvent tout de même être associées à la colite ulcéreuse, telles qu'une épargne du rectum, une atteinte segmentaire avec inflammation périappendiculaire (« caecal patch ») et une inflammation iléale active (« backwash ileitis ») <sup>26</sup>. Par contre, la présence de granulomes épithélioïdes et d'iléite chronique active sont spécifiques à la maladie de Crohn <sup>26</sup>.

On peut d'ailleurs distinguer une atteinte iléale secondaire à la maladie de Crohn d'une « backwash ileitis » secondaire à la colite ulcéreuse sachant que la dernière est associée à une pancolite avec atteinte sévère du caecum, une inflammation iléale légère sur une longueur maximale de 5 cm et très peu de changements histologiques chroniques (plutôt une infiltration polymorphonucléaire légère avec cryptite focale) <sup>18, 195</sup>. De plus, malgré que la présence de granulomes soit également possible en colite ulcéreuse, ceux-ci sont associés à une rupture des cryptes et une extravasation de mucine<sup>26</sup>. En comparaison, les granulomes en maladie de Crohn sont épithélioïdes non caséeux et non associés avec des cryptes rupturées <sup>26</sup>. Mentionnons finalement que nous ne pourrions appliquer le terme « colite indéterminée » à ce sous-groupe, car il s'agit d'une définition basée sur l'évaluation d'un spécimen chirurgical et non de biopsies coliques <sup>17, 26</sup>.



En résumé, plusieurs arguments nous ont incité à maintenir un diagnostic de maladie de Crohn parmi les patients avec phénotype endoscopique « UC-like ». Cependant, étant donné qu'il n'y a pas eu d'évaluation histologique du colon entier de ces patients en comparaison avec la littérature décrivant la colite de Crohn « UC-like », il est possible que certains de ces 15 patients étaient en fait atteints de colite ulcéreuse, expliquant l'utilisation et l'efficacité antérieure de traitements de 5-ASA <sup>26</sup>. Cela renforce néanmoins la spécificité des observations au sein du sous-groupe avec un phénotype endoscopique typique Crohn, dans lequel les corrélations entre les marqueurs d'activation des granulocytes et la sévérité endoscopique étaient les plus fortes.

### 3. Expression du CD64 sur les neutrophiles en maladie de Crohn adulte

Tout comme l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques en présence de maladie B1, l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants était également corrélée à la sévérité de la maladie (**Tableau VI**). Le CD64 est un récepteur transmembranaire Fc exprimé sur les neutrophiles, mais également sur les macrophages et les monocytes <sup>93, 196</sup>. Son expression est principalement stimulée par l'IFN $\gamma$  <sup>93</sup> (en maladie de Crohn, principalement produit par les cellules Th1 et NK de la lamina propria<sup>197, 198</sup>). Les IgG1, IgG3 et des agrégats d'IgG s'y lient avec une forte affinité, ce qui stimule la phagocytose et le « burst » oxydatif <sup>93, 129</sup>. En présence de maladie de Crohn, l'expression du CD64 a été corrélée avec l'activité clinique et la protéine C réactive dans une cohorte adulte et plus récemment avec le SES-CD dans une cohorte pédiatrique selon deux études publiées par Minar et collègues <sup>112, 113</sup>. D'une part, un « index CD64 » sur les granulocytes circulants (défini par le rapport entre la MFI du CD64 sur les cellules comparativement à celle de billes témoins) permettait de discriminer les patients avec nouveaux diagnostics de maladie de Crohn comparativement aux individus sans maladie inflammatoire intestinale et était corrélé au SES-CD <sup>112</sup>. Une seconde étude incluant un plus grand échantillon de patients a confirmé l'utilité de l'index CD64 pour discriminer les enfants avec et sans maladie de Crohn ainsi que les maladies actives des maladies quiescentes <sup>113</sup>.

L'association entre l'index et la sévérité de la maladie semblait cependant préférentielle aux enfants nouvellement diagnostiqués. De plus, il ne permettait pas de discriminer les patients avec maladie légère de ceux en rémission endoscopique <sup>113</sup>. Tout comme ces auteurs, nous avons démontré une corrélation positive entre l'expression du CD64 et le SES-CD dans une cohorte de patients adultes atteinte de maladie de Crohn et plus spécifiquement, parmi les individus nouvellement diagnostiqués (**Tableau VI**). Cependant, notre étude offrait une analyse plus spécifique du CD64, distinguant son expression sur les neutrophiles et les eosinophiles. En effet, bien que Minar et collègues utilisent en alternance les termes « polymorphonucléaires » et « neutrophiles » pour désigner leurs cellules d'intérêt, leur méthode d'identification cellulaire ne permet pas de distinguer les neutrophiles des eosinophiles exprimant le CD64 <sup>128</sup>, tout comme plusieurs études avec méthodologie similaire <sup>111-113, 199, 200</sup>. De plus, nous avons observé une expression du CD64 sur les eosinophiles circulants et coliques (**Figure 30**), ainsi qu'une corrélation entre l'expression du CD64 sur les eosinophiles circulants et la sévérité de la maladie parmi les individus nouvellement diagnostiqués (**Tableau VII**), il est dès lors possible que la corrélation rapportée par Minar et collègue parmi les enfants nouvellement diagnostiqués incluait des eosinophiles, ce qui suggère qu'en maladie de Crohn naïve au traitement, les neutrophiles ne soient pas les seuls granulocytes activés et exprimant le CD64. Cette expression du CD64 par les eosinophiles fut d'ailleurs rapportée au niveau de la muqueuse dans un modèle murin de colite et semblait être associée à l'activation des eosinophiles et dépendante du GM-CSF <sup>201</sup>. Par ailleurs, en utilisant le CD66b dans notre méthode d'identification des neutrophiles et des eosinophiles, nous avons possiblement exclu une sous-population de neutrophiles quiescent exprimant faiblement le CD66b <sup>16</sup>. Pour répondre à cette faiblesse potentielle, nous avons confirmé que l'expression du CD64 n'était pas modifiée sur les cellules CD15<sup>+</sup> CD9<sup>neg</sup> FcεRI<sup>neg</sup> SSC<sup>high</sup> avec et sans l'utilisation du CD66b.

Les corrélations avec le SES-CD rapportées par Minar et collègues étaient assez variables et incluait des individus en rémission endoscopique dans les deux études <sup>112, 113</sup>. L'inclusion

d'individus avec un SES-CD de 0 associée à une faible expression du CD64 sur les neutrophiles circulants augmente la valeur du coefficient de corrélation et reflète davantage la différence entre l'expression du CD64 en maladie active comparativement à celle parmi des individus en rémission. En excluant les individus en rémission de nos analyses de corrélation, nous ciblons l'impact de l'expression des marqueurs d'activation uniquement en présence de maladie active, confirmant l'association de l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants avec le degré d'inflammation colique <sup>112, 113</sup>. Tout comme Minar et collègues, nous n'avons pas démontré de différence entre les individus avec une maladie légère et ceux en rémission endoscopique (**Figure 32**) <sup>113</sup>. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité ethnique des groupes de patients, les neutrophiles des Africains semblant exprimer davantage de CD64 <sup>129</sup>. D'autre part, nos résultats étant également significatifs dans le groupe nouvellement diagnostiqué, le traitement pourrait avoir un effet sur l'expression du CD64 et un seuil spécifique à chaque traitement pourrait être requis pour définir la rémission et l'activité de la maladie <sup>113</sup>. Bien que l'effet des corticostéroïdes sur l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants demeure controversé <sup>109, 199</sup>, et qu'elle ne semblait pas influencée par le type de traitement dans notre cohorte ainsi que dans une cohorte atteinte de polyarthrite rhumatoïde <sup>202</sup>, une forte expression du CD64 sur les neutrophiles circulants et au sein de la muqueuse colique (évaluée par ARN) fut toutefois associée à une perte de réponse aux anti-TNF <sup>92, 200</sup>. Enfin, il est possible que le processus inflammatoire stimulant l'expression du CD64 soit déclenché uniquement en présence d'un niveau de cytokines plus élevé ou d'une translocation bactérienne accrue et donc, plutôt associé aux maladies modérées et sévères.

Curieusement, nous avons observé une expression plus forte du CD64 sur les neutrophiles coliques des contrôles sains et des individus en rémission endoscopique comparativement à ceux avec maladie active, tout en notant une expression accrue dans la muqueuse comparativement au sang dans tous les groupes (**Figure 23**). L'expression du CD64 sur les neutrophiles coliques en maladie de Crohn active était toutefois positivement corrélée avec la sévérité endoscopique en présence de maladie active exclusivement colique (L2) (**Tableau XV**).

Le colon sain contient très peu de neutrophiles, dont le rôle est de neutraliser les microorganismes traversant la barrière épithéliale <sup>67</sup>. Les neutrophiles quiescents exprimeraient faiblement le CD64 et un délai de 4 à 6 heures est requis *in vitro* pour augmenter l'expression de ce récepteur <sup>93</sup>. Minar et collègue ont observé une expression accrue de l'ARNm du FcγRI (CD64) au niveau de l'ileon et du rectum parmi les enfants avec maladie de Crohn comparativement aux contrôles sans maladie <sup>112</sup>. Wojtal et collègues ont également observé une expression accrue de l'ARNm du CD64 au sein de la muqueuse colique des individus en non-réponse à l'infliximab, comparativement aux répondeurs et aux contrôles sains <sup>92</sup>. Cependant, cette méthode d'analyse ne permet pas d'identifier l'origine cellulaire du CD64. Tillinger et collègues ont quant à eux démontré la présence de neutrophiles exprimant le CD64 par immunohistochimie au sein de la lamina propria et près de l'épithélium dans des biopsies coliques d'individus avec maladie de Crohn active. Toutefois, ils n'ont pas évalué l'activation ou la quantité de neutrophiles au sein de la muqueuse inflammée comparativement aux individus sans maladie inflammatoire intestinale <sup>111</sup>. Une hypothèse mécanistique évoquée à propos du CD64 sur le neutrophile est que la perméabilité intestinale stimulerait le contact entre des antigènes intraluminaux et les lymphocytes B de la lamina propria, engendrant la production d'IgG qui activeraient à leur tour les neutrophiles et monocytes exprimant le CD64 <sup>111</sup>. Nos analyses démontrent cependant curieusement une expression plus forte de ce marqueur parmi les individus en rémission endoscopique et les contrôles sains. Cela ne semble pas être l'effet du traitement, en ne comparant que les individus avec maladie active et non traitée aux contrôles sains ou aux individus en rémission, les différences persistaient ( $p = 0.0001$  et  $p < 0.04$  respectivement). Cette plus faible expression du CD64, tout en étant corrélé avec la sévérité endoscopique de la maladie colique, pourrait être le reflet d'une insensibilité relative du neutrophile aux médiateurs stimulant l'expression du CD64, tels que l'IFN $\gamma$  et le G-CSF, au profit d'une expression du CD66b, ce qui pourrait corroborer les observations de dysfonction de la phagocytose et du burst oxydatif publiées antérieurement <sup>13, 14, 96</sup>. Il est également possible qu'on observe parmi les contrôles sains une augmentation de l'avidité des récepteurs pour l'anticorps, sans qu'il y en ait davantage à leur surface, un phénomène nommé « inside-out signalling » <sup>90</sup>. Ce phénomène,

décrit pour le Fc $\gamma$ RI (CD64), le Fc $\gamma$ RIIa (CD32a) et le Fc $\alpha$ RI (CD89), implique une augmentation de la capacité de liaison du récepteur en réponse à des cytokines et chimiokines<sup>90</sup>. Enfin, notre utilisation de la moyenne arithmétique comme représentation de la MFI peut avoir surestimé les valeurs chez les individus avec peu de cellules (contrôles sains et individus en rémission), comparativement à la moyenne géométrique. En effet, la moyenne géométrique est un peu moins influencée par les extrêmes, et donc, en présence d'un échantillon comprenant un très faible nombre de cellules, serait moins influencé par quelques cellules exprimant fortement l'antigène. Par contre, le fait que seul l'expression du CD64 sur les neutrophiles et non le CD66b sur les neutrophiles et les éosinophiles soit significativement plus élevé dans la muqueuse des contrôles sains comparativement aux individus avec maladie de Crohn active rend cette hypothèse moins plausible.

#### 4. Quelle est l'implication des éosinophiles et de leur expression du CD66b en maladie de Crohn?

Les éosinophiles circulants ont été peu étudiés à ce jour en maladies inflammatoires intestinales, mais semblent avoir des implications dans la sévérité de la maladie. Nous avons démontré une faible corrélation entre la fréquence des éosinophiles circulants et la sévérité endoscopique de la maladie parmi les individus avec phénotype endoscopique typique et cette corrélation était plus forte parmi les individus sans traitement récent (**Tableau IV**). Une étude pédiatrique dont les participants avaient surtout une atteinte iléocolique a démontré une association entre l'éosinophilie au moment du diagnostic et une maladie clinique plus sévère évaluée par le PCDAI<sup>203</sup>. Le GM-CSF stimulerait selon un modèle murin la production, la survie, l'activation et l'accumulation des éosinophiles dans le colon. Ces éosinophiles relâcheraient subséquemment du TNF $\alpha$  et de l'EPO, contribuant aux dommages muqueux<sup>201</sup>. Paradoxalement, il a été décrit que les éosinophiles pouvaient produire du GM-CSF, possiblement en réponse à l'IFN $\gamma$ , stimulant leur recrutement et survie, ainsi que celle des neutrophiles<sup>118</sup>.

Cependant, leur fréquence au sein de la muqueuse inflammée n'était pas accrue comparativement à la muqueuse saine (**Figure 9**), corroborant certaines études <sup>115, 135</sup>, mais contraire à d'autres <sup>107, 130</sup>. Cette absence de différence peut être expliquée par le fait que nous prenions des biopsies dans le caecum chez les contrôles sains et individus en guérison complète de la muqueuse, zone comportant une concentration d'éosinophiles supérieure au reste du colon, pouvant alors masquer différence potentielle avec la fréquence des éosinophiles muqueux des individus avec maladie de Crohn active <sup>204</sup>. Il n'en demeure pas moins que nous n'avons pas observé de corrélation parmi les individus avec maladie active, entre la fréquence ou l'expression de CD66b et CD64 par les eosinophiles coliques et la sévérité endoscopique de la maladie, impliquant possiblement un effet différentiel du GM-CSF sur ces cellules comparativement aux neutrophiles chez l'humain.

La fréquence des eosinophiles coliques était toutefois significativement diminuée parmi les individus avec maladie sténosante ou fistulisante. Bien que cette observation soit en apparente contradiction avec certaines études ayant dénoté une infiltration accrue des eosinophiles en présence de sténose iléale <sup>140</sup>, il est important de préciser que les biopsies ont été prises au sein du colon inflammatoire et non la paroi intestinale de la sténose, et l'évaluation des cellules, par cytométrie de flux et non immunohistochimie. Notre stratification se basant sur le comportement antérieur et actuel de la maladie, certains individus n'avaient pas de sténose active au moment de la coloscopie, mais avaient subi une résection chirurgicale antérieure pour une maladie sténosante ou fistulisante colique ou iléocolique. Enfin, les corticostéroïdes et les anti-TNF purent avoir un effet sur le recrutement des eosinophiles, tel qu'illustré à la **figure 15B**. Ces individus représentant plus de la moitié du sous-groupe avec maladie sténosante ou fistulisante (**Tableau II**), le traitement aurait donc pu avoir un effet sur la diminution de la fréquence des eosinophiles observée parmi le groupe avec maladie sténosante ou fistulisante.

Bien que nous n'ayions pas démontré de différence entre l'expression du CD66b sur les éosinophiles circulants en maladie active comparativement aux individus en rémission, son niveau d'expression était corrélé à la sévérité endoscopique en présence de maladie de Crohn B1 avec phénotype endoscopique typique. Alors que tous les éosinophiles expriment à l'état de base une certaine quantité de CD66b, ce dernier stimule leur adhésion à l'endothélium, la production de superoxydes et la relâche de médiateurs proinflammatoires, pouvant donc jouer un rôle dans la maladie <sup>85</sup>. En plus du fMLP, l'IL-33 a également été décrit comme pouvant augmenter l'expression du CD66b sur les éosinophiles circulants et sa concentration épithéliale est accrue parmi les individus avec maladie de Crohn iléale pédiatrique et au sein de la muqueuse colique inflammée chez l'adulte <sup>127, 140, 145</sup>. Cette « uprégulation » du CD66b sur les éosinophiles circulants semble avoir lieu uniquement en présence de maladie endoscopique sévère, son expression en maladie légère à modérée n'étant pas différente de celle des individus en rémission. Étant donné que la concentration d'IL-33 au sein de l'épithélium serait corrélée à l'activité histologique et au score de fibrose en maladie sténosante iléale pédiatrique <sup>140</sup>, le suivi longitudinal à long terme de nos 25 patients avec maladie B1 et phénotype endoscopique typique sera très informatif pour évaluer si l'expression de ce marqueur peut être prédictive d'une progression vers une maladie sténosante.

#### 5. Pourquoi y avait-il préférentiellement des basophiles et mastocytes au sein de la muqueuse des individus avec maladie B1?

La muqueuse inflammée était aussi infiltrée par des basophiles, en accord avec deux études récentes <sup>145, 159</sup>. Nous avons précisé ces observations en démontrant une infiltration préférentielle dans la muqueuse des individus avec maladie non sténosante, non fistulante (B1) et une absence de corrélation avec la sévérité endoscopique, sauf parmi les individus avec maladie iléocolique (**Figure 16A et Tableau XV**). Le rôle des basophiles dans la pathogenèse de la maladie demeure méconnu, mais ils semblent stimuler une réponse Th17/Th1 de la part des cellules T effectrices mémoires CCR7<sup>+</sup> <sup>159</sup>. Tout comme les éosinophiles, les basophiles peuvent

être activés par l'IL-5 et le GM-CSF <sup>147</sup>. Par ailleurs, ils peuvent être également activés par le fMLP et produire des médiateurs proinflammatoires lipidiques, du GM-CSF et de l'IL8, contribuant au recrutement des neutrophiles <sup>148, 149, 161, 205</sup>. Malgré que nous n'ayions pas observé une corrélation significative entre les basophiles et les neutrophiles coliques, la corrélation négative entre les basophiles de la muqueuse et les neutrophiles circulants (**Figure 18C**) suggère un rôle dans le recrutement des neutrophiles au sein de la muqueuse.

L'absence de différences quant aux fréquences des mastocytes dans la muqueuse des individus avec maladie de Crohn active, inactive et les contrôles sains fut également notée antérieurement <sup>150, 159</sup>. Nous n'avons pas démontré de corrélation avec la sévérité endoscopique, comparativement à Winterkamp et collègues, qui ont démontré une corrélation entre l'excrétion du N-méthyl histamine, qu'ils ont estimé être un indicateur de la présence des mastocytes, et la sévérité endoscopique dans une cohorte incluant des individus avec maladie active et inactive <sup>162</sup>. Cependant, l'histamine n'étant pas produite exclusivement par les mastocytes, il est possible que cette observation résulte d'une action combinée avec les basophiles <sup>147, 162</sup>. De plus, les différents sous-types de mastocytes semblent avoir des localisations et des effets spécifiques dans le tube digestif <sup>150, 151</sup>. Nos observations, tout comme une partie de la littérature existante, ne tiennent cependant pas compte du potentiel de dégranulation des mastocytes en maladie inflammatoire active <sup>150</sup>. De plus, nous avons analysé la présence de mastocytes par cytométrie de flux, à partir de biopsies de la muqueuse, ne permettant pas d'évaluer les mastocytes de la sous-muqueuse, ni de distinguer s'ils produisaient de la chymase et/ou de la tryptase <sup>150, 169</sup>.

L'activation des mastocytes peut toutefois certainement contribuer au recrutement des autres granulocytes au sein de la muqueuse inflammée <sup>150, 151</sup>, d'où la corrélation observée entre les fréquences des mastocytes et des basophiles muqueux, possiblement via la production d'histamine et de prostaglandines D2 <sup>146, 152</sup>. La réduction de l'infiltration par les mastocytes de la muqueuse des patients avec maladie sténosante ou fistulisante comparativement aux



contrôles sains pourrait indiquer une plus grande dégranulation des mastocytes chez ces patients; une étude n'ayant pas démontré de différence significative quant à l'excrétion urinaire de N-méthyl histamine parmi les individus avec maladie fistulissante laisse supposer que les mastocytes sont présents et activés peu importe le comportement de la maladie <sup>162</sup>.

La diminution des fréquences des eosinophiles et des basophiles également observées chez les individus avec maladie sténosante ou fistulissante milite par contre en faveur d'une réelle diminution de la fréquence des mastocytes. En effet, en plus de recruter les basophiles au sein des tissus inflammés, les mastocytes peuvent via l'IL-5, la prostaglandine D2, l'histamine, la tryptase et le PAF recruter et activer les eosinophiles <sup>149, 167, 206</sup>.

#### 6. Pourquoi y avait-il moins de basophiles circulants parmi les individus avec maladie de Crohn active?

Nous avons observé une fréquence de basophiles circulants en présence de maladie active inférieure à celle des individus en rémission endoscopique. Cette observation est en apparence contradiction avec une publication récente <sup>159</sup>. Cependant, notre méthodologie consistait en une lyse des globules rouges, obtenant ainsi une suspension avec l'ensemble des autres cellules hématopoïétiques circulantes alors que Chapuy et collègues ont opté pour une technique « Lymphoprep » élargie, excluant tout de même des cellules de forte densité, notamment des neutrophiles. En comparant ces deux méthodes, les différences quant à la fréquence des basophiles étaient variables d'un individu à l'autre, et on observait de surcroît moins de cellules CD45+ viables avec la technique ACK. Somme toute, une différence d'au moins 30% entre les deux méthodes fut observée. De plus, comparativement à Chapuy et al., nous n'avons pas émis comme critères d'exclusion la présence d'allergie ou d'asthme parmi nos participants; il est possible que nos contrôles sains et individus en rémission endoscopique présentaient une prévalence plus élevée de comorbidités allergiques.

## 7. Effets du traitement sur les résultats observés

Il est à souligner que malgré que nous ayons dichotomisé les individus sous traitement selon leur prise ou non d'anti-TNF, notre cohorte demeure très hétérogène, la catégorie de traitement « non anti-TNF » comprenant 5 médicaments différents ainsi que des combinaisons. De plus, nous n'avons pas évalué systématiquement les niveaux thérapeutiques et la présence d'anticorps chez les individus avec maladie active malgré un traitement de thiopurines ou d'anti-TNF et donc, nous n'avons pas distingué les individus avec maladie active en raison d'une dose inadéquate de médicament de ceux avec une vraie perte de réponse.

En établissant notre recrutement selon le type de traitement des participants, nous avons voulu à la fois contrôler l'effet de ce paramètre sur nos analyses de sous-groupes, mais également déterminer si l'exposition à un traitement modifiait le profil granulocytaire. Cette stratégie visait à éviter un déséquilibre causé par le traitement dans la cohorte entière. Par contre, les individus avec maladies sténosante ou fistulisante étaient davantage traités avec des anti-TNF, et les individus sans traitement récent avaient majoritairement des maladies de Crohn iléocoliques (**Tableau II**). La faible corrélation observée entre la fréquence des éosinophiles circulants et le SES-CD parmi les individus avec phénotype endoscopique CD typique pourrait ainsi avoir été influencée par celle observée chez les individus avec maladie iléocolique (**Tableaux IV et XV**).

## 8. Certaines corrélations avec le SES-CD étaient influencées par la localisation de la maladie

En accord avec la littérature, la majorité des individus inclus dans notre cohorte avec une maladie de Crohn exclusivement colique était classée comme une maladie B1, alors que la majorité des individus avec maladie sténosante ou fistulisante présentait une maladie iléocolique <sup>3, 21</sup>. Cependant, aucune corrélation significative ne fut observée entre les

fréquences cellulaires et l'expression du CD66b ou du CD64 et le SES-CD parmi les individus avec maladie sténosante ou fistulisante, comparativement aux individus avec maladie B1. De plus, les corrélations impliquant le CD64 sur les neutrophiles circulants et le CD66b sur les neutrophiles coliques n'étaient plus observées en stratifiant la cohorte selon la localisation de la maladie. Par contre, le score d'activation neutrophilique et l'expression du CD64 sur les neutrophiles de la muqueuse étaient corrélés avec le SES-CD en maladie exclusivement colique alors que le score d'activation granulocytaire sanguin, la fréquence des eosinophiles circulants et celles des basophiles coliques étaient préférentiellement corrélés avec le SES-CD en maladie iléocolique (**Tableau XV**). En ne considérant que le SES-CD des segments coliques chez ces patients, les corrélations impliquant la fréquence des eosinophiles circulants, le score d'activation granulocytaire ainsi que les basophiles coliques persistaient, mais des corrélations avec l'expression du CD66b sur les neutrophiles colique ( $r = 0.40$   $p < 0.04$ ) ainsi qu'avec le score d'activation neutrophilique ( $r = 0.42$   $p < 0.03$ ) étaient à nouveau observées. On retient donc que l'évaluation des neutrophiles de la muqueuse colique reflète la sévérité des lésions coliques, alors que la fréquence et l'activation des eosinophiles circulants, ainsi que la fréquence des basophiles muqueux coliques reflètent la sévérité endoscopique uniquement lorsqu'il y a une atteinte iléale concomitante.

Le rôle différentiel du GM-CSF en maladie colique comparativement à la maladie iléale pourrait expliquer en partie cette observation. Effectivement, la concentration du GM-CSF est accrue au sein de la muqueuse colique inflammée, où il contribue à retarder l'apoptose des neutrophiles, à stimuler l'expression du CD66b et possiblement celle du CD64 <sup>15, 201, 207, 208</sup>. Toutefois, le rôle du GM-CSF dans la pathogenèse de la maladie de Crohn semble varier selon le comportement de la maladie, certaines études pointant vers une association entre la présence d'autoanticorps médiés contre le GM-CSF et la maladie iléale sténosante <sup>96</sup>, expliquant possiblement la corrélation préférentielle entre le CD66b sur les neutrophiles coliques et le SES-CD au sein du groupe de patients avec maladie B1.

Fait intéressant, les corrélations entre la fréquence des éosinophiles circulants ainsi que des basophiles coliques avec le SES-CD parmi les individus avec maladie iléocolique étaient positives uniquement en considérant les individus non traités (sans traitement récent ou nouveaux diagnostics,  $r = 0.72$   $p < 0.006$  et  $r = 0.55$   $p < 0.05$  respectivement), alors que la corrélation entre le score d'activation granulocytaire sanguin et le SES-CD n'était positive que chez les individus avec maladie réfractaire à un traitement ( $r = 0.59$   $p < 0.04$ ). Ces corrélations illustrent un potentiel recrutement et activation des basophiles au sein de la muqueuse colique en présence d'une inflammation iléale non traitée. Les basophiles sont recrutés au sein du tissu principalement par l'histamine, la prostaglandine D2 et l'IL-3<sup>146</sup> et leur fréquence dans notre cohorte d'individus avec maladie active était corrélée avec celle des basophiles circulants et des mastocytes (**Figure 18A et B**). L'excrétion urinaire d'histamine ayant été antérieurement corrélée à la sévérité endoscopique de la maladie, il est possible que les basophiles et mastocytes soient davantage activés en présence d'une maladie iléocolique<sup>162</sup>. Cependant, aucune littérature ne s'est intéressée à l'infiltration et activation des basophiles au sein de la muqueuse iléale et nous n'avons examiné que des biopsies coliques. De plus, l'action des basophiles étant potentialisée par l'IL-33<sup>209</sup>, une autre hypothèse serait que la concentration accrue de cette cytokine au sein de la muqueuse iléale et colique en maladie de Crohn soit proportionnelle à la sévérité endoscopique de la maladie, quoique non confirmé à ce jour<sup>140, 145</sup>. Les basophiles tissulaires pourraient ensuite contribuer à la relâche médullaire et au recrutement d'éosinophiles, entre autres, via une production d'IL-5<sup>65</sup>. Enfin, la corrélation observée entre le score d'activation granulocytaire sanguin et la sévérité endoscopique de la maladie parmi les individus avec maladie réfractaire au traitement suppose plutôt une augmentation de l'activation des granulocytes circulants (via l'IL-33 et l'INF $\gamma$ ) au sein de cette population<sup>92, 127</sup>. Ces observations laissent donc supposer un profil immunitaire différent en présence d'une atteinte iléale, comparativement à une atteinte colique exclusive, tout comme ces maladies semblent distinctes du point de vue génétique<sup>20, 210</sup>.

## 9. Utilité des scores d'activation granulocytaire proposés

L'activation des neutrophiles circulants et tissulaires était corrélée à la sévérité endoscopique en maladie de Crohn active (**Tableau VI**). Toutefois, l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants n'est pas spécifique à la maladie de Crohn, pouvant être élevée en présence de n'importe quel processus infectieux, incluant probablement l'abcès périanal ou intraabdominal<sup>97, 111</sup>. De plus, tel que discuté précédemment, le CD64 semble plutôt distinguer en maladie de Crohn la présence d'inflammation significative et son expression peut être modulée selon l'ethnie et la réponse aux anti-TNF<sup>92, 113, 129, 200</sup>. Nous avons donc combiné l'expression de ce marqueur à celle du CD66b sur les neutrophiles coliques, également corrélé avec la sévérité de la maladie parmi les individus avec maladie B1 et fortement discriminant entre les individus avec guérison complète de la muqueuse et ceux avec un SES-CD  $\geq 1$  (**Figure 31**) pour créer le score d'activation neutrophilique. De plus, quoiqu'uniquement corrélé avec le SES-CD en présence de maladie B1 et phénotype endoscopique typique, l'ajout de l'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants au CD64 sur les neutrophiles circulants résultait en un score d'activation granulocytaire sanguin qui était corrélé avec le SES-CD dans l'ensemble des sous-groupes (**Tableau XIII**).

Minar et collègues ont récemment publié plusieurs adaptations de l'évaluation du CD64, notamment, un ratio de l'expression du CD64 sur les granulocytes par rapport à celle exprimée par des billes de calibration, un ratio de l'expression du CD64 sur les granulocytes par rapport à son expression sur des lymphocytes circulants (NCAR) ainsi que la mesure du CD64 soluble par ELISA<sup>113</sup>. Les auteurs ont proposé des seuils pour chaque marqueur pour différencier les individus avec SES-CD  $\geq 3$  des individus en rémission endoscopique, mais leurs sensibilités étaient sous-optimales (57 à 65%)<sup>113</sup>. Nous avons obtenu des résultats similaires avec notre score sanguin, témoignant de la grande hétérogénéité de l'expression du CD64 (**Tableaux IX et XIV**).

L'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques ainsi que le score d'activation neutrophilique étaient pour leur part très performants pour discriminer la guérison complète de la muqueuse (**Figures 31 et 33**). Ainsi, l'évaluation de l'activation des neutrophiles coliques pourrait être avantageuse pour apprécier la présence d'inflammation lorsqu'une mauvaise préparation colique empêche de conclure avec certitude à une guérison muqueuse. Parmi nos individus avec maladie B1 ou phénotype endoscopique typique, un score d'activation neutrophilique inférieur à 8754 offrait une sensibilité de 90.9% pour détecter la guérison muqueuse complète (**Tableau XII**).

Le CD64 soluble ainsi que le ratio entre l'expression sur les granulocytes et les lymphocytes (NCAR) présentés par Minar et collègues étaient significativement différents entre les individus avec maladie légère vs modérée et légère vs sévère <sup>113</sup>. Nos scores d'activation neutrophilique permettaient également de différencier les individus avec maladie sévère de ceux avec maladie légère (**Figures 33 et 34**). En ce qui a trait à l'expression du CD64, nous avons par contre observé des résultats différents selon le comportement de la maladie, l'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants étant uniquement discriminante pour la sévérité de la maladie parmi les individus avec phénotype endoscopique typique (**Figure 32**), alors que le score d'activation granulocytaire sanguin permettait une distinction de la maladie endoscopique sévère parmi tous les sous-groupes, avec une spécificité pour un score > 6863 de 93.7% parmi les individus avec maladie B1 et phénotype endoscopique typique (**Tableau XIV**). Enfin, la variation des scores selon l'évolution de la maladie nous offre une autre possibilité d'utilisation de ceux-ci; les deux scores ayant doublé en présence d'une récurrence et ont diminué au moins de moitié en fonction de la réponse ou de la rémission endoscopique (**Figure 35**).

La calprotectine fécale est un marqueur utilisé pour détecter une inflammation de la muqueuse et donc, offre une bonne valeur prédictive négative pour exclure une maladie inflammatoire lors d'un bilan pour symptômes gastrointestinaux <sup>113, 211</sup>. Elle est également

utilisée pour le suivi des individus avec maladie inflammatoire intestinale, permettant de prédire la rémission endoscopique, ainsi que la rechute post-opératoire <sup>57, 212</sup>. Sipponen et collègues ont récemment démontré une corrélation entre la valeur de la calprotectine et le SES-CD, ainsi qu'une différence significative de la calprotectine entre les maladies endoscopiques légères, modérées et sévères, quoique les SES-CD séparant chaque catégorie étaient sensiblement différents de ceux que nous avons sélectionné pour notre étude <sup>51</sup>. Par ailleurs, notre étude comprenait trop peu d'individus ayant eu un dosage de calprotectine fécale dans les jours précédant la coloscopie pour que nous puissions comparer sa performance avec celles des scores proposés. Minar et collègues ont observé une corrélation entre la calprotectine et le CD64 sur les neutrophiles circulants, ainsi qu'une performance équivalente du CD64 et de la calprotectine pour distinguer les individus avec et sans maladie de Crohn, ainsi que ceux avec maladie de Crohn active (SES-CD  $\geq 3$ ) et inactive <sup>113</sup>. Notre étude était également différente dans l'optique où nous voulions évaluer la performance des marqueurs pour distinguer la guérison muqueuse complète (SES-CD = 0), comparativement à Minar et collègues qui ont voulu discriminer les individus avec activité endoscopique (SES-CD  $\geq 3$ ) <sup>113</sup>. Enfin, bien que la calprotectine fécale puisse prédire parmi les patients atteint de colite ulcéreuse une guérison muqueuse complète (AUC 0.88), sa performance en maladie de Crohn demeure inconnue<sup>213</sup>.

Nous sommes les premiers à quantifier l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques et les eosinophiles circulants pour évaluer la sévérité de la maladie ainsi que la guérison muqueuse complète. Un score sanguin demeure plus attrayant pour le patient qu'un test dans les selles tel que la calprotectine fécale, et le score d'activation granulocytaire offre une bonne corrélation avec le SES-CD (**Tableau XIII**), ainsi qu'une performance adéquate (AUC 0.88) pour discriminer les individus avec maladie sévère parmi le sous-groupe CD-B1 (**Tableau XIV**). Par ailleurs, la cytométrie de flux est de plus en plus répandue dans les hôpitaux et nous obtenons avec notre stratégie d'identification des populations très distinctes, ce qui permettrait une certaine automatisation des analyses. Enfin, aucun indice de guérison complète de la

muqueuse n'est validé en maladie de Crohn et 63% des enfants en rémission endoscopique avaient toutefois une calprotectine > 200 dans une cohorte pédiatrique <sup>214</sup>. Nos données avec le score d'activation neutrophilique confirment que les indices muqueux sont actuellement supérieurs aux indices sanguins et fécaux pour évaluer la guérison muqueuse.

L'expression du CD64 sur les neutrophiles circulants a été comparée entre un groupe d'enfants avec maladie de Crohn et un autre sans maladie inflammatoire intestinale <sup>112, 113</sup> et permettait de discriminer dans une cohorte adulte les individus avec intolérance alimentaire, entérocolite bactérienne et maladie inflammatoire intestinale <sup>111</sup>. L'expression du CD66b sur les eosinophiles circulants et sur les neutrophiles coliques parmi des individus avec syndrome de l'intestin irritable, intolérances alimentaires ou infection bactérienne n'a pas été étudiée à ce jour. Un plus grand échantillon d'individus avec et sans maladie inflammatoire intestinale est donc nécessaire pour valider l'utilisation de ces scores. Il serait également pertinent que cette cohorte comprenne des individus avec maladie iléale exclusive, abcès intra-abdominaux ou périanaux, ainsi qu'un plus grand nombre d'individus traités avec chaque classe de médicaments, incluant les anti IL12/IL23 et les anti-intégrines  $\alpha 4\beta 7$ .

#### 10. Quels autres index d'activité aurions-nous pu utiliser?

Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre la sévérité clinique et endoscopique et de surcroît, la majorité des individus évalués étaient considérés comme en rémission clinique selon le HBI et ce, malgré la présence de diarrhée ou de douleur abdominale (un score < 5 étant considéré comme étant en rémission, **Annexe III**). Cette adaptation du CDAI est toutefois couramment utilisée en clinique et validée <sup>34</sup>. Par ailleurs, rappelons que le CDAI considère également comme étant en rémission clinique certains individus avec symptômes gastrointestinaux légers. Cette absence de corrélation entre les symptômes du patient et la sévérité endoscopique est bien connue depuis près de 30 ans <sup>44, 45, 48, 215</sup>. Toutefois, nous aurions pu opter pour un score reflétant davantage l'impact sur la qualité de vie du patient,



l'impression du médecin ainsi que la charge inflammatoire tel que le HBI-PRO (publié après l'initiation de cette étude)<sup>215</sup>. Le SES-CD, et non le CDEIS, fut favorisé étant donné qu'en plus d'être corrélé avec le CDEIS, il est plus simple d'utilisation et serait même plus fiable pour l'évaluation de la variation de la sévérité endoscopique dans le temps<sup>171, 172</sup>. Par contre, le SES-CD ne permet pas la distinction entre les ulcérations superficielles et profondes, ces dernières ayant été proposées comme étant un prédicteur de mauvais pronostic<sup>185</sup>. De plus, il demeure limité pour l'évaluation de l'iléon terminal et un même score peut représenter différents types d'atteintes (par exemple, une atteinte légère pancolique vs. une atteinte sévère sur une portion du colon peuvent correspondre à un score équivalent). C'est pourquoi nous avons répété les différentes analyses en ne prenant d'une part, que le score SES-CD du segment biopsié et d'autre part, un score excluant l'iléon terminal, étant donné que pour certains patients, alors que la biopsie ne provenait pas de l'iléon, le score de ce segment majorait significativement le score global. Ces deux analyses supplémentaires n'ont pas invalidé les corrélations précédemment observées. Enfin, une méthodologie similaire, mais avec le nouveau *Crohn's Disease Overall Disease Severity Index (Annexe VII)*, établi par des cliniciens selon des critères cliniques, paracliniques, endoscopiques et l'histoire antérieure de la maladie<sup>59</sup> permettrait d'évaluer si par exemple, le statut d'activation des granulocytes aurait un effet global sur la maladie et son décours.

## Conclusions générales et perspectives futures

La maladie de Crohn est un processus inflammatoire complexe qui englobe plusieurs maladies distinctes selon leur localisation, comportement, aspect endoscopique et implications pronostiques. L'obtention d'une guérison de la muqueuse est un prédicteur de bon pronostic, mais la coloscopie comporte des risques pour le patient et des implications socioéconomiques, surtout dans notre contexte québécois de ressources limitées, d'où la recherche active de biomarqueurs pour le suivi de l'activité de la maladie. D'autre part, le caractère discontinu des lésions de la maladie réduit la fiabilité de l'évaluation histologique en termes de présence / fréquences cellulaires, comparativement à la colite ulcéreuse.

Dans cette étude, nous avons démontré une accumulation de neutrophiles au sein de la muqueuse inflammée et une corrélation avec la sévérité endoscopique uniquement parmi les individus avec un phénotype endoscopique « UC-like ». Par contre, l'expression de marqueurs d'activation à la surface des neutrophiles (CD66b au niveau du colon et CD64 au niveau du sang), ainsi que sur les éosinophiles (CD66b au niveau du sang) étaient tous corrélés à la sévérité endoscopique parmi les individus avec maladie B1 et phénotype endoscopique typique.

Les deux scores d'activation granulocytaires que nous proposons ont permis d'évaluer l'inflammation de la muqueuse et la sévérité endoscopique, et ainsi une distinction entre la guérison muqueuse complète et la présence d'inflammation macroscopique, en plus de discriminer les individus avec maladie sévère selon l'évaluation endoscopique des individus avec maladie légère à modérée.

Ce travail s'intéresse au profil granulocytaire colique et circulant exclusivement parmi les individus avec maladie de Crohn colique ou iléocolique et offre ainsi la possibilité d'explorer plusieurs concepts et méthodologies similaires. D'une part, des études subséquentes sont

nécessaires pour évaluer la relation entre l'activation des granulocytes et la sévérité endoscopique parmi les individus avec une maladie exclusivement iléale, en analysant à la fois les cellules du sang et de la muqueuse iléale et colique; il serait des plus intéressants de déterminer si le profil granulocytaire au niveau du caecum macroscopiquement normal peut indiquer une maladie iléale active. L'évaluation de l'expression du CD66b sur les neutrophiles coliques d'une zone macroscopiquement saine à distance d'un segment inflammé et sa comparaison à celle des neutrophiles d'individus en guérison muqueuse complète permettrait d'évaluer si ce marqueur pourrait être valide, peu importe le site de la biopsie, pour évaluer l'activité de la maladie et aurait donc un intérêt en présence d'une préparation colique inadéquate ou pour considérer la possibilité de n'effectuer qu'une coloscopie courte. Par contre, plusieurs de nos corrélations et différences étant légères, valider les performances de ces marqueurs sur une plus grande cohorte s'avère nécessaire.

Tel que mentionné précédemment, confronter ces analyses à un score plus global, tel que le *Crohn's Disease Overall Disease Severity Index*, permettrait de valider l'effet de l'activation des granulocytes sur la sévérité globale de la maladie. Il reste néanmoins à démontrer si l'expression du CD66b et du CD64 sur le neutrophile est le reflet d'un rôle pathologique ou bien la conséquence d'une inflammation déjà établie. L'expression du CD64 ayant été rapporté comme étant prédicteur de rechute dans une cohorte pédiatrique traitée avec des agents anti-TNF<sup>200</sup> et un de nos participants avec une forte expression du CD64 sur ses neutrophiles circulants au moment du diagnostic ayant développé une maladie agressive avec notamment, une maladie périanale environ 24 mois après l'inclusion, des études prospectives seront requises pour vérifier le rôle pronostique de ces marqueurs et scores.

Enfin, les granulocytes ne constituent qu'une fraction des cellules liées à l'inflammation en maladie de Crohn et interagissent avec les autres cellules de l'immunité innée et adaptative. Une étude évaluant la corrélation entre la sévérité globale de la maladie et le profil des lymphocytes B, lymphocytes T, des ILC et des cellules dendritiques pourrait mener à de

nouvelles hypothèses physiopathologiques et à la découverte de nouveaux biomarqueurs potentiels.

À la lumière des données présentées, nous proposons que le recrutement des neutrophiles activés au sein de la muqueuse colique est impliqué dans la pathogenèse de la maladie de Crohn. Les scores d'activation pourraient être des biomarqueurs intéressants pour évaluer l'inflammation muqueuse et la sévérité de la maladie de Crohn.

## ANNEXE I

### Classification de Montréal pour la maladie de Crohn

<b>Table 1</b> Vienna and Montreal classification for Crohn's disease		
	<b>Vienna</b>	<b>Montreal</b>
Age at diagnosis	A1 below 40 y A2 above 40 y	A1 below 16 y A2 between 17 and 40 y A3 above 40 y
Location	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 upper	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 isolated upper disease*
Behaviour	B1 non-strictureing, non-penetrating B2 strictureing B3 penetrating	B1 non-strictureing, non-penetrating B2 strictureing B3 penetrating p perianal disease modifier†
*L4 is a modifier that can be added to L1–L3 when concomitant upper gastrointestinal disease is present. †"p" is added to B1–B3 when concomitant perianal disease is present.		

Tiré de Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749-53.

## ANNEXE II

### Crohn's Disease Activity Index (CDAI)

**Table 1.** Crohn Disease Activity Index (CDAI)<sup>a</sup>

Variable	Description	Score	Multiplier
No. of liquid stools	Sum of 7 days		2
Abdominal pain	Sum of 7 days	0 = none; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe	5
General well-being	Sum of 7 days	0 = generally well; 1 = slightly under par; 2 = poor; 3 = very poor; 4 = terrible	7
Extraintestinal complications	Number of listed complications	Arthritis, arthralgia, iritis, uveitis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, aphthous stomatitis, anal fissure/fistula/abscess, fever >37.8°C (100°F)	20
Antidiarrheal drugs	Use in the previous 7 days	0 = no; 1 = yes	30
Abdominal mass		0 = no; 2 = questionable; 5 = definite	10
Hematocrit	Expected minus observed level	Male: 47% – observed; female: 42% – observed	6
Body weight	Use in the previous 7 days	1 – (ideal observed) × 100	1 (not if <10)

<sup>a</sup>Remission: CDAI score <150. Response: decrease in CDAI score of >70 or >100 (depending on trial). Moderate to severe Crohn disease: CDAI score of 220-450. Severe Crohn disease: CDAI score >450.<sup>12</sup>

Tiré de Cheifetz A. Management of Active Crohn Disease. JAMA 2013; 309 (20); 2150-8

## ANNEXE III

### Indice Harvey Bradshaw

**Table 1.** Harvey-Bradshaw Simple Index<sup>8</sup>

Variable	Description	Scoring
1	General well-being	0 = very well 1 = slightly below par 2 = poor 3 = very poor 4 = terrible
2	Abdominal pain	0 = none 1 = mild 2 = moderate 3 = severe
3	Number of liquid stools daily	1 per occurrence
4	Abdominal mass	0 = none 1 = dubious 2 = definite 3 = definite and tender
5	Complications	1 per item: <ul style="list-style-type: none"> <li>● Arthralgia</li> <li>● Uveitis</li> <li>● Erythema nodosum</li> <li>● Aphthous ulcer</li> <li>● Pyoderma gangrenosum</li> <li>● Anal fissure</li> <li>● New fistula</li> <li>● Abscess</li> </ul>
Total score		Sum of variable scores

Tiré de Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the crohn's disease activity and harvey-bradshaw indices in assessing crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;**8**:357-63

## ANNEXE IV

### Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity

Table 6 *Format for calculation of the Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) shown with an example*

	Rectum	Sigmoid and left colon	Transverse colon	Right colon	Ileum								
Deep ulceration quote 12 if present in the segment 0 if absent	0	+	0	+	12	+	0	+	/	=	12	Total 1	
Superficial ulceration quote 6 if present in the segment 0 if absent	0	+	0	+	6	+	6	+	/	=	12	Total 2	
Surface involved by the disease measured in cm*	0-0	+	2-0	+	8-0	+	6-0	+	/	=	16-0	Total 3	
Ulcerated surface measured in cm*	0-0	+	0-0	+	6-0	+	1-5	+	/	=	07-5	Total 4	
Total 1 + Total 2 + Total 3 + Total 4 =											=	47-5	Total A
Number (n) of segments totally or partially explored (1-5) =											=	4	n
Total A divided by n											=	11-9	Total B
Quote 3 if ulcerated stenosis anywhere, 0 if not											+	0	C
Quote 3 if non ulcerated stenosis anywhere, 0 if not											+	3	D
Total B + C + D											=	14-9	CDEIS
+ for partially explored segments and for the ileum, the 10cm linear scale represents the surface effectively explored													

\*For partially explored segments and for the ileum, the 10 cm linear scale represents the surface effectively explored.

The findings at this colonoscopy are as follows:

- (a) normal rectum;
  - (b) presence of non-ulcerative lesions involving 20% of the sigmoid and left colon area;
  - (c) 80% of the transverse colon area was diseased including superficial and deep ulcerations; the ulcerations represent 60% of the segment surface;
  - (d) the right colon was incompletely explored, due to a non ulcerated stenosis, 60% of the explored right colon was diseased, 15% being accounted for by superficial ulcerations;
  - (e) ileum was not reached.
- No ulcerated stenosis was seen anywhere.

Tiré de Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for crohn's disease: A prospective multicentre study. Groupe d'etudes therapeutiques des affections inflammatoires du tube digestif (getaid). *Gut* 1989;**30**:983-9



## ANNEXE V

### Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease

	Ileum	Right colon	Transverse colon	Left colon	Rectum	Total
<b>Presence and size of ulcers (0-3)</b>	--	2	1	1	1	<b>5</b>
<b>Extent of ulcerated surface (0-3)</b>	--	1	1	1	1	<b>4</b>
<b>Extent of affected surface (0-3)</b>	--	2	1	1	1	<b>5</b>
<b>Presence and type of narrowings (0-3)</b>	--	3	0	0	0	<b>3</b>
<b>SES-CD =</b>						<b>17</b>

Tiré de Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, *et al.* Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for crohn's disease: The ses-cd. *Gastrointest Endosc* 2004;**60**:505-12

## ANNEXE VI

### Global Histologic Disease Activity Score

**Table 2.** Scoring System for Histological Abnormalities in Crohn's Disease Mucosal Biopsy Specimens

Epithelial damage	0, Normal 1, Focal pathology 2, Extensive pathology
Architectural changes	0, Normal 1, Moderately disturbed (<50%) 2, Severely disturbed (>50%)
Infiltration of mononuclear cells in the lamina propria	0, Normal 1, Moderate increase 2, Severe increase
Infiltration of polymorphonuclear cells in the lamina propria	0, Normal 1, Moderate increase 2, Severe increase
Polymorphonuclear cells in epithelium	1, In surface epithelium 2, Cryptitis 3, Crypt abscess
Presence of erosion and/or ulcers	0, No 1, Yes
Presence of granuloma	0, No 1, Yes
No. of biopsy specimens affected	0, None (0 of 6) 1, ≤33% (1 or 2 of 6) 2, 33%–66% (3 or 4 of 6) 3, >66% (5 or 6 of 6)

NOTE. Each topic was scored independently. Moderate increase, up to twice the number of cells that can normally be expected; severe increase, more than twice the normal number of cells.

Tiré de D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998;114:262-267

## ANNEXE VII

### Crohn's Disease Overall Disease Severity Index

Attribute	Level	Score
Mucosal lesions	No mucosal lesions	0
	Small mucosal lesions as confirmed by MRI or endoscopy	6
	Large or deep mucosal lesions as confirmed by MRI or endoscopy	16
Fistula	No fistula at the time of clinic visit	0
	Has fistula at the time of clinic visit	11
Perianal abscess	No perianal abscess at the time of clinic visit	0
	Has perianal abscess at the time of clinic visit	10
Intestinal resections	No intestinal resections	0
	At least one intestinal resection <40 cm	2
	At least one intestinal resection ≥40 cm	7
Stoma	No stoma at the time of clinic visit	0
	Has stoma at the time of clinic visit	7
Disease extent	Limited disease (<40 cm ileal involvement, or absence of pancolitis)	0
	Extensive disease (ileal involvement of at least 40 cm or presence of pancolitis)	6
Frequency loose stools	<10 loose stools per week	0
	At least 10 loose stools per week	6
Stricture	No stricture at the time of visit	0
	Has stricture at the time of visit	5
CRP level	Normal CRP levels (1–3 mg/L)	0
	Slightly elevated CRP levels (3–5 mg/L)	2
	Elevated CRP levels (above 5 mg/L)	5
Biologics use	Has never used biologics/immunomodulators	0
	Has experienced some symptom improvement with the use of biologics/immunomodulators	2
	Has not experienced symptom improvement with the use of biologics/immunomodulators	5
Daily activity impact	Disease does not significantly impact daily activities	0
	Disease significantly impacts daily activities	5
Albumin level	Normal albumin level (>3.5 g/dL)	0
	Low albumin level (<3.5 g/dL)	4
Anorectal symptoms	None of the following: anorectal pain, bowel urgency, incontinence, discharge, tenesmus	0
	At least one of the following: anorectal pain, bowel urgency, incontinence, discharge, tenesmus	4
Anaemia	Not anaemic (according to WHO criteria)	0
	Anaemic (according to WHO criteria)	4
Abdominal pain	Infrequent abdominal pain (less than daily)	0
	Daily abdominal pain	3
Steroid use	No steroid use within the past year	0
	Has steroid use within the past year	2

CRP, C reactive protein.

Tiré de Siegel CA, Whitman CB, Spiegel BMR, et al. Development of an index to define overall disease severity in IBD. Gut. 2018;67:244-254.

## Références

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer G. Regional Ileitis: a pathologic and clinical entity. JAMA. 1932;99:1323-1329
2. Rocchi A, Benchimol EI, Bernstein CN, et al. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. Can J Gastroenterol. 2012;26:811-817
3. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140:1785-1794
4. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, et al. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. Gastroenterology. 2010;139:1147-1155
5. Peyrin-Biroulet L, Panes J, Sandborn WJ, et al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016;14:348-354 e317
6. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. Am J Gastroenterol. 2015;110:1324-1338
7. Baars JE, Nuij VJ, Oldenburg B, et al. Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. Inflamm Bowel Dis. 2012;18:1634-1640
8. Laharie D, Reffet A, Belleanne G, et al. Mucosal healing with methotrexate in Crohn's disease: a prospective comparative study with azathioprine and infliximab. Aliment Pharmacol Ther. 2011;33:714-721
9. Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. Gastroenterology. 2017;152:327-339 e324
10. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. Gastroenterology. 1998;114:262-267

11. Magro F, Langner C, Driessen A, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:827-851
12. Harbord MW, Marks DJ, Forbes A, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in Crohn's disease relates to reduced production of chemokines and can be augmented by granulocyte-colony stimulating factor. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:651-660
13. Hayee B, Rahman FZ, Tempero J, et al. The neutrophil respiratory burst and bacterial digestion in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1482-1488
14. Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006;367:668-678
15. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010;115:335-343
16. Kvedaraite E, Lourda M, Idestrom M, et al. Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut*. 2016;65:1632-1641
17. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55:749-753
18. Patil DT, Greenson JK, Odze RD. Inflammatory Disorders of the Large Intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, eds. *Odze & Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. 3rd edition ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015:436-511
19. Louis E, Collard A, Oger AF, et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001;49:777-782
20. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*. 2016;387:156-167
21. Hancock L, Beckly J, Geremia A, et al. Clinical and molecular characteristics of isolated colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1667-1677
22. Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;152:340-350 e346

23. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8:244-250
24. Kerur B, Machan JT, Shapiro JM, et al. Biologics Delay Progression of Crohn's Disease, but Not Early Surgery, in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018
25. Kugathasan S, Denson LA, Walters TD, et al. Prediction of complicated disease course for children newly diagnosed with Crohn's disease: a multicentre inception cohort study. *Lancet*. 2017;389:1710-1718
26. Yantiss RK, Odze RD. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology*. 2006;48:116-132
27. Bemelman WA, Warusavitarne J, Sampietro GM, et al. ECCO-ESCP Consensus on Surgery for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 2018;12:1-16
28. Soucy G, Wang HH, Farraye FA, et al. Clinical and pathological analysis of colonic Crohn's disease, including a subgroup with ulcerative colitis-like features. *Mod Pathol*. 2012;25:295-307
29. James SD, Wise PE, Zuluaga-Toro T, et al. Identification of pathologic features associated with "ulcerative colitis-like" Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:13139-13145
30. Magro F. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2013;7:827-851
31. Annese V, Daperno M, Rutter MD, et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:982-1018
32. Gomollon F, Dignass A, Annese V, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017;11:3-25
33. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70:439-444
34. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, et al. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:357-363

35. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1:514
36. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut*. 1989;30:983-989
37. Vuitton L, Marteau P, Sandborn WJ, et al. IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut*. 2016;65:1447-1455
38. Rutgeerts P, Van Assche G, Sandborn WJ, et al. Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial. *Gastroenterology*. 2012;142:1102-1111 e1102
39. Khanna R, Zou G, D'Haens G, et al. Reliability among central readers in the evaluation of endoscopic findings from patients with Crohn's disease. *Gut*. 2016;65:1119-1125
40. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004;60:505-512
41. Molander P, Sipponen T, Kemppainen H, et al. Achievement of deep remission during scheduled maintenance therapy with TNFalpha-blocking agents in IBD. *J Crohns Colitis*. 2013;7:730-735
42. Novak G, Parker CE, Pai RK, et al. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;7:CD012351
43. Solem CA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:707-712
44. Modigliani R, Mary JY, Simon JF, et al. Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology*. 1990;98:811-818

45. Jones J, Loftus EV, Jr., Panaccione R, et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6:1218-1224
46. Khanna R, Nelson SA, Feagan BG, et al. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016:CD010642
47. Green E.H Al-Hawary MM PD, Zimmermann, EM AJ. Endoscopic score extracted from scope report correlates with Crohn's disease activity and CT enterography findings. . *Digestive Disease Week: Gastroenterology;* 2011:S426
48. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF, et al. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut.* 2014;63:88-95
49. Geboes K, Rutgeerts P, Opdenakker G, et al. Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. *Curr Med Res Opin.* 2005;21:1741-1754
50. Agnholt J, Dahlerup JF, Buntzen S, et al. Response, relapse and mucosal immune regulation after infliximab treatment in fistulating Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:703-710
51. Sipponen T, Karkkainen P, Savilahti E, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:1221-1229
52. Bourgonje AR, von Martels JZH, de Vos P, et al. Increased fecal calprotectin levels in Crohn's disease correlate with elevated serum Th1- and Th17-associated cytokines. *PLoS One.* 2018;13:e0193202
53. Panes J, Jairath V, Levesque BG. Advances in Use of Endoscopy, Radiology, and Biomarkers to Monitor Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2017;152:362-373 e363
54. Siemons L, Ten Klooster PM, Vonkeman HE, et al. How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:368



55. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:21-29
56. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, et al. Calprotectin, calgranulin C, and other members of the s100 protein family in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1601-1611
57. Lobaton T, Lopez-Garcia A, Rodriguez-Moranta F, et al. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:e641-651
58. Bressler B, Panaccione R, Fedorak RN, et al. Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2015;29:369-372
59. Siegel CA, Whitman CB, Spiegel BMR, et al. Development of an index to define overall disease severity in IBD. *Gut*. 2018;67:244-254
60. Lemmens B, Arijs I, Van Assche G, et al. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:1194-1201
61. Bessissow T, Lemmens B, Ferrante M, et al. Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:1684-1692
62. Azad S, Sood N, Sood A. Biological and histological parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis: a prospective study. *Saudi J Gastroenterol*. 2011;17:194-198
63. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut*. 1991;32:174-178
64. Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, et al. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2001;120:13-20
65. Scapini PT, N.; Pucillo, C.; Cassatella, M.A. Granulocytes and Mast Cells. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. 7th edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2013:468-486

66. Drissen R, Buza-Vidas N, Woll P, et al. Distinct myeloid progenitor-differentiation pathways identified through single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol.* 2016;17:666-676
67. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012;5:354-366
68. Wera O, Lancellotti P, Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med.* 2016;5
69. Rahman FZ, Marks DJ, Hayee BH, et al. Phagocyte dysfunction and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1443-1452
70. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843:2563-2582
71. Kato T, Kitagawa S. Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines. *Int J Hematol.* 2006;84:205-209
72. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:519-531
73. Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1998;114:1066-1090
74. Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S, et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014;63:578-587
75. Marks DJ, Miyagi K, Rahman FZ, et al. Inflammatory bowel disease in CGD reproduces the clinicopathological features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:117-124
76. Sena A, Grishina I, Thai A, et al. Dysregulation of anti-inflammatory annexin A1 expression in progressive Crohns Disease. *PLoS One.* 2013;8:e76969
77. Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity.* 2014;40:66-77
78. Colgan SP. Neutrophils and inflammatory resolution in the mucosa. *Semin Immunol.* 2015;27:177-183

79. Kelly CJ, Glover LE, Campbell EL, et al. Fundamental role for HIF-1alpha in constitutive expression of human beta defensin-1. *Mucosal Immunol.* 2013;6:1110-1118
80. Hall CHT, Campbell EL, Colgan SP. Neutrophils as Components of Mucosal Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;4:329-337
81. Campbell EL, Kao DJ, Colgan SP. Neutrophils and the inflammatory tissue microenvironment in the mucosa. *Immunol Rev.* 2016;273:112-120
82. Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, et al. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur J Immunol.* 1996;26:2924-2932
83. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1996;60:106-117
84. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, et al. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol.* 1999;163:5592-5598
85. Yoon J, Terada A, Kita H. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol.* 2007;179:8454-8462
86. Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, et al. Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry A.* 2004;57:53-62
87. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28:260-274
88. Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, et al. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol.* 2006;67:676-682
89. Nair KS, Zingde SM. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol.* 2001;208:96-106
90. Brandsma AM, Jacobino SR, Meyer S, et al. Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy. *Immunol Rev.* 2015;268:74-87
91. Murphy K. The Humoral Immune Response. *Janeway's Immunobiology.* 8th ed. New York, USA: Garland Science Taylor & Francis Group; 2012:387-428

92. Wojtal KA, Rogler G, Scharl M, et al. Fc gamma receptor CD64 modulates the inhibitory activity of infliximab. *PLoS One*. 2012;7:e43361
93. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:903-916
94. Buckle AM, Hogg N. The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol*. 1989;143:2295-2301
95. Kerst JM, de Haas M, van der Schoot CE, et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood*. 1993;82:3265-3272
96. Jurickova I, Collins MH, Chalk C, et al. Paediatric Crohn disease patients with stricturing behaviour exhibit ileal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) autoantibody production and reduced neutrophil bacterial killing and GM-CSF bioactivity. *Clin Exp Immunol*. 2013;172:455-465
97. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, et al. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:654-661
98. Segal AW, Loewi G. Neutrophil dysfunction in Crohn's disease. *Lancet*. 1976;2:219-221
99. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*. 2009;206:1883-1897
100. MacDermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol*. 1999;19:266-272
101. Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, et al. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock*. 2000;13:361-366
102. Comalada M, Peppelenbosch MP. Impaired innate immunity in Crohn's disease. *Trends Mol Med*. 2006;12:397-399
103. Levine AP, Segal AW. What is wrong with granulocytes in inflammatory bowel diseases? *Dig Dis*. 2013;31:321-327

104. Segal AW, Ensell J, Munro JM, et al. Indium-111 tagged leucocytes in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1981;2:230-232
105. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut*. 2000;47:506-513
106. Saverymuttu SH, Peters AM, Lavender JP, et al. 111Indium autologous leucocytes in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1983;24:293-299
107. Lampinen M, Backman M, Winqvist O, et al. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1392-1399
108. Zhou G, Yu L, Fang L, et al. CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut*. 2017
109. Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, et al. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol*. 1999;50:433-439
110. Schmidt T, Brodesser A, Schnitzler N, et al. CD66b Overexpression and Loss of C5a Receptors as Surface Markers for Staphylococcus aureus-Induced Neutrophil Dysfunction. *PLoS One*. 2015;10:e0132703
111. Tillinger W, Jilch R, Jilma B, et al. Expression of the high-affinity IgG receptor FcRI (CD64) in patients with inflammatory bowel disease: a new biomarker for gastroenterologic diagnostics. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:102-109
112. Minar P, Haberman Y, Jurickova I, et al. Utility of neutrophil Fcγ receptor I (CD64) index as a biomarker for mucosal inflammation in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:1037-1048
113. Minar P, Jackson K, Tsai YT, et al. Validation of Neutrophil CD64 Blood Biomarkers to Detect Mucosal Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;24:198-208
114. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:746-760
115. Wedemeyer J, Vosskuhl K. Role of gastrointestinal eosinophils in inflammatory bowel disease and intestinal tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008;22:537-549

116. Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, et al. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52:650-661
117. Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29:7-14
118. Kim JT, Gleich GJ, Kita H. Roles of CD9 molecules in survival and activation of human eosinophils. *J Immunol.* 1997;159:926-933
119. Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest.* 1999;103:1719-1727
120. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature.* 2013;502:245-248
121. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-174
122. Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB, et al. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol Rev.* 2001;179:139-155
123. Srivastava AL, G.Y.; Odze, R.D. Algorithmic Approach to Diagnosis of Inflammatory Disorders of the Gastrointestinal Tract. In: Odze RDG, J.R., ed. *Odze & Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015:286-304
124. Okpara N, Aswad B, Baffy G. Eosinophilic colitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15:2975-2979
125. DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, et al. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol.* 2006;9:210-218
126. Lowichik A, Weinberg AG. A quantitative evaluation of mucosal eosinophils in the pediatric gastrointestinal tract. *Mod Pathol.* 1996;9:110-114
127. McKernan E. IL-33 is a Potent Stimulus for Eosinophil Activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;141:AB72
128. Bournazos S, Wang TT, Ravetch JV. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr.* 2016;4
129. Hoffmeyer F, Witte K, Schmidt RE. The high-affinity Fc γ RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology.* 1997;92:544-552

130. Carvalho AT, Elia CC, de Souza HS, et al. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:120-125
131. Rubio CA. A method for the detection of eosinophilic granulocytes in colonoscopic biopsies from IBD patients. *Pathol Res Pract*. 2003;199:145-150
132. Rehman MQ, Beal D, Liang Y, et al. B cells secrete eotaxin-1 in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:922-933
133. Mir A, Minguez M, Tatay J, et al. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1452-1457
134. Coppi LC, Thomazzi SM, de Ayrizono ML, et al. Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:211-218
135. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology*. 1996;28:1-13
136. Luck W, Becker M, Niggemann B, et al. In vitro release of eosinophil cationic protein from peripheral eosinophils reflects disease activity in childhood Crohn disease and ulcerative colitis. *Eur J Pediatr*. 1997;156:921-924
137. Martin JC, Beriou G, Heslan M, et al. IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol*. 2016;9:539-549
138. Dubucquoi S, Janin A, Klein O, et al. Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. *Gut*. 1995;37:242-246
139. Brennan GT, Melton SD, Spechler SJ, et al. Clinical Implications of Histologic Abnormalities in Ileocolonic Biopsies of Patients With Crohn's Disease in Remission. *J Clin Gastroenterol*. 2017;51:43-48
140. Masterson JC, Capocelli KE, Hosford L, et al. Eosinophils and IL-33 Perpetuate Chronic Inflammation and Fibrosis in a Pediatric Population with Stricturing Crohn's Ileitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:2429-2440
141. Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol*. 2015;8:464-475
142. Lampinen M, Ronnblom A, Amin K, et al. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut*. 2005;54:1714-1720

143. Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF-beta in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol.* 2017;52:777-787
144. Masterson JC, McNamee EN, Fillon SA, et al. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut.* 2015;64:1236-1247
145. Wakahara K, Baba N, Van VQ, et al. Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood.* 2012;120:4761-4771
146. Sarfati M, Wakahara K, Chapuy L, et al. Mutual Interaction of Basophils and T Cells in Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2015;6:399
147. Steiner M, Huber S, Harrer A, et al. The Evolution of Human Basophil Biology from Neglect towards Understanding of Their Immune Functions. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8232830
148. Dvorak AM, Warner JA, Fox P, et al. Recovery of human basophils after FMLP-stimulated secretion. *Clin Exp Allergy.* 1996;26:281-294
149. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S73-80
150. Bischoff SC. Mast cells in gastrointestinal disorders. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:139-145
151. Boeckxstaens G. Mast cells and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;25:45-49
152. Conti P, Caraffa A, Ronconi G, et al. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: Inhibitory effect of IL-37. *Eur J Pharmacol.* 2018;818:294-299
153. Luna-Gomes T, Bozza PT, Bandeira-Melo C. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Front Pharmacol.* 2013;4:27
154. Brenner SA, Zacheja S, Schaffer M, et al. Soluble CD14 is essential for lipopolysaccharide-dependent activation of human intestinal mast cells from macroscopically normal as well as Crohn's disease tissue. *Immunology.* 2014;143:174-183
155. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, et al. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity.* 2013;38:570-580



156. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, et al. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*. 2011;475:110-113
157. Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity*. 2015;42:216-226
158. Reber LL, Frossard N. Targeting mast cells in inflammatory diseases. *Pharmacol Ther*. 2014;142:416-435
159. Chapuy L, Bsath M, Mehta H, et al. Basophils increase in Crohn disease and ulcerative colitis and favor mesenteric lymph node memory TH17/TH1 response. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:978-981 e971
160. Bouchelouche PN, Berild D, Nielsen OH, et al. Leukotriene B4 receptor levels and intracellular calcium signalling in polymorphonuclear leukocytes from patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7:349-356
161. Steiner M, Hawranek T, Schneider M, et al. Elevated Toll-Like Receptor-Induced CXCL8 Secretion in Human Blood Basophils from Allergic Donors Is Independent of Toll-Like Receptor Expression Levels. *PLoS One*. 2016;11:e0149275
162. Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, et al. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:3071-3077
163. Raithel M, Matek M, Baenkler HW, et al. Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;108:127-133
164. Knutson L, Ahrenstedt O, Odland B, et al. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990;98:849-854
165. Xie H, He SH. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2851-2857
166. Ramsay DB, Stephen S, Borum M, et al. Mast cells in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010;6:772-777
167. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:21-33

168. Andoh A, Deguchi Y, Inatomi O, et al. Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncol Rep.* 2006;16:103-107
169. Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, et al. Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut.* 1999;45:210-217
170. Fox CC, Lichtenstein LM, Roche JK. Intestinal mast cell responses in idiopathic inflammatory bowel disease. Histamine release from human intestinal mast cells in response to gut epithelial proteins. *Dig Dis Sci.* 1993;38:1105-1112
171. Khanna R, Zou G, Stitt L, et al. Responsiveness of Endoscopic Indices of Disease Activity for Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* 2017;112:1584-1592
172. Vuitton L, Marteau P, Sandborn WJ, et al. IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut.* 2015
173. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010;138:463-468; quiz e410-461
174. Baba N, Van VQ, Wakahara K, et al. CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1beta and TNF. *J Exp Med.* 2013;210:1251-1263
175. Murphy K. Appendix II. CD Antigens. *Janeway's Immunobiology.* 8th ed. New York, USA: Garland Science Taylor & Francis Group; 2012:763-778
176. Kita H, Gleich GJ. Eosinophils and IgE receptors: a continuing controversy. *Blood.* 1997;89:3497-3501
177. Mora J, Riggs EK, Fu J, et al. Expression of the high affinity IgE receptor by neutrophils of individuals with allergic asthma is both minimal and insensitive to regulation by serum IgE. *Clin Immunol.* 2009;132:132-140
178. Weber PS, Toelboell T, Chang LC, et al. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2004;75:815-827
179. Schleimer RP, Bochner BS. The effects of glucocorticoids on human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:1202-1213

180. Hastings R, Ding T, Butt S, et al. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:764-769
181. Agnholt J, Kelsen J, Brandsborg B, et al. Increased production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in Crohn's disease--a possible target for infliximab treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16:649-655
182. Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P, et al. IL-5 and TNF-alpha participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2001;46:2004-2009
183. Temkin V, Levi-Schaffer F. Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival. *Cytokine*. 2001;15:20-26
184. Ordas I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. *Gut*. 2011;60:1754-1763
185. Allez M, Lemann M, Bonnet J, et al. Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:947-953
186. Rutgeerts P, Reinisch W, Colombel JF, et al. Agreement of site and central readings of ileocolonoscopy scores in Crohn's disease: comparison using data from the EXTEND trial. *Gastrointest Endosc*. 2016;83:188-197 e181-183
187. Geremia A, Arancibia-Carcamo CV. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front Immunol*. 2017;8:1296
188. Noguchi M, Hiwatashi N, Liu ZX, et al. Increased secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mucosal lesions of inflammatory bowel disease. *Digestion*. 2001;63 Suppl 1:32-36
189. Dabritz J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and the intestinal innate immune cell homeostasis in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306:G455-465
190. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58:1152-1167

191. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:329-342
192. Scapini P, Marini O, Tecchio C, et al. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev.* 2016;273:48-60
193. Flores C, Francesconi CF, Meurer L. Quantitative assessment of CD30+ lymphocytes and eosinophils for the histopathological differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2015;9:763-768
194. Joo M, Odze RD. Rectal sparing and skip lesions in ulcerative colitis: a comparative study of endoscopic and histologic findings in patients who underwent proctocolectomy. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:689-696
195. Haskell H, Andrews CW, Jr., Reddy SI, et al. Pathologic features and clinical significance of "backwash" ileitis in ulcerative colitis. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1472-1481
196. Guillemins M, Bruhns P, Saeys Y, et al. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:94-108
197. Abraham C, Dulai PS, Vermeire S, et al. Lessons Learned From Trials Targeting Cytokine Pathways in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2017;152:374-388 e374
198. Chinen H, Matsuoka K, Sato T, et al. Lamina propria c-kit+ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. *Gastroenterology.* 2007;133:559-573
199. Tillinger W, Gasche C, Reinisch W, et al. Influence of topically and systemically active steroids on circulating leukocytes in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:1848-1853
200. Minar P, Jackson K, Tsai YT, et al. A Low Neutrophil CD64 Index Is Associated with Sustained Remission During Infliximab Maintenance Therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22:2641-2647
201. Griseri T, Arnold IC, Pearson C, et al. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated Eosinophils Promote Interleukin-23 Driven Chronic Colitis. *Immunity.* 2015;43:187-199

202. Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N, et al. CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2006;33:2416-2424
203. Sadi G, Yang Q, Dufault B, et al. Prevalence of Peripheral Eosinophilia at Diagnosis in Children With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62:573-576
204. Polydorides AD, Banner BF, Hannaway PJ, et al. Evaluation of site-specific and seasonal variation in colonic mucosal eosinophils. *Hum Pathol*. 2008;39:832-836
205. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, et al. LTB<sub>4</sub> is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell*. 2012;22:1079-1091
206. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:9-22
207. Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, et al. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14:46-53
208. Buckle AM, Jayaram Y, Hogg N. Colony-stimulating factors and interferon-gamma differentially affect cell surface molecules shared by monocytes and neutrophils. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:339-345
209. Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2010;40:1836-1842
210. Cleynen I, Gonzalez JR, Figueroa C, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut*. 2013;62:1556-1565
211. Menees SB, Powell C, Kurlander J, et al. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:444-454
212. Wright EK, Kamm MA, De Cruz P, et al. Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery. *Gastroenterology*. 2015;148:938-947 e931

213. Lee SH, Kim MJ, Chang K, et al. Fecal calprotectin predicts complete mucosal healing and better correlates with the ulcerative colitis endoscopic index of severity than with the Mayo endoscopic subscore in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.* 2017;17:110
214. Zubin G, Peter L. Predicting Endoscopic Crohn's Disease Activity Before and After Induction Therapy in Children: A Comprehensive Assessment of PCDAI, CRP, and Fecal Calprotectin. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21:1386-1391
215. Zittan E, Kabakchiev B, Kelly OB, et al. Development of the Harvey-Bradshaw Index-pro (HBI-PRO) Score to Assess Endoscopic Disease Activity in Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2017;11:543-548